



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MODELOS DE AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE

Trabalho submetido por
Raquel Leal Gameiro
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Fevereiro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MODELOS DE AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE

Trabalho submetido por
Raquel Leal Gameiro
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Álvaro Lopes

Fevereiro de 2016

Dedicatória

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, pelo apoio incondicional, amizade, força, motivação e carinho. O meu eterno agradecimento

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer a ajuda e cooperação do meu orientador, ao Professor Doutor Álvaro Lopes pela paciência, pelo conhecimento que me transmitiu e ajuda prestada.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e a todo o seu corpo docente e não docente, por me ter acolhido ao longo destes anos. Um muito obrigado pela forma amável, aberta e atenciosa com que fui recebida nas respetivas instalações. A todos os professores que estiveram envolvidos na parte letiva deste mestrado, pelos seus ensinamentos, e por todo o auxílio e compreensão, o meu muito obrigado.

Agradeço aos meus pais, ao meu irmão por todo o apoio e motivação que me deram ao longo de toda a minha vida pessoal e desta jornada académica, sem os quais tudo isto não teria sido possível.

A todos os meus amigos e colegas de curso, pelos momentos de amizade, diversão e cumplicidade vividos durante o meu percurso académico que jamais esquecerei.

Um muito obrigado ao Coro Académico Egas Moniz por me oferecer momentos onde a boa disposição e a música ajudaram a que todo o trabalho árduo ficasse mais harmonioso.

Não posso deixar de agradecer a toda a equipa da Farmácia Cunha Pinheiro, por toda a atenção, disponibilidade e orientação que me proporcionaram, assim como aos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar de Setúbal.

A Todos o meu sincero e grande Obrigado!

Resumo

A Neurotoxicologia é uma das áreas de especialização da Toxicologia orientada para o estudo dos efeitos de substâncias tóxicas no sistema nervoso.

Destaca-se por ser uma ciência que se ocupa em analisar os riscos químicos ambientais aos quais o Homem está exposto de forma significativa, os efeitos que possam resultar do desenvolvimento de novos fármacos assim como na análise de potenciais outros compostos que se revelem passíveis de gerar um efeito neurotóxico.

As áreas de maior ênfase na investigação e de interesse no âmbito da Neurotoxicologia, incluem neuropatologia, neurofisiologia, neuroquímica, neurofarmacologia, neurologia, toxicologia comportamental, neurotoxicologia do desenvolvimento, psiquiatria, epidemiologia, psicologia, avaliação de risco e questões regulatórias.

O comportamento consiste num conjunto global das reações externamente observáveis de um sujeito à ação de um estímulo do mundo exterior, constituindo assim o meio primário pelo qual um dado organismo interage com o seu ambiente, sendo por isso uma chave fundamental e emergente na avaliação da neurotoxicidade.

Esta área da investigação é uma área em constante mudança e sempre em expansão com um permanente recurso a novos e otimizados modelos de avaliação.

A presente monografia propõe-se fazer uma abordagem das características principais deste ramo das neurociências e da toxicologia, dos mecanismos de ação e sobretudo de alguns dos principais modelos de avaliação de efeitos, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave

Toxicologia; Neurotoxicologia; Substâncias neurotóxicas; Modelos de Avaliação.

Abstract

The Neurotoxicology is one of the areas of specialization of the Toxicology guided for the study of the effects of toxic substances in the nervous system.

It stands out for being a science that is in charge of analyzing the environmental chemical risks to which humans are exposed in a significant way, the effects that can result of the development of new drugs as well as in the analysis of potentials others compounds that are revealed susceptible to generate an neurotoxic effect.

The areas of larger emphasis in the investigation and of interest in the extent of Neurotoxicology include neuropathology, neurophysiology, neurochemical, neuropharmacology, neurology, toxicology behavioral, developmental neurotoxicology, psychiatry, epidemiology, psychology, risk assessment and regulatory issues.

The behavior is a global set of externally observable reactions of a subject to the action of a stimulus from the outside world, thus constituting the primary means by which an organism interacts with its environment, so it is a fundamental and emerging key in evaluating neurotoxicity.

This area of research is an area of constant change and ever expanding with a permanent resource for new and optimized evaluation models.

This dissertation proposes to make an approach to the main features of this branch of neuroscience and toxicology, mechanisms of action and especially some of the main models for evaluating effects, through in vivo and in vitro assays

Keywords

Toxicology; Neurotoxicology; Neurotoxin substances; Evaluation Models.

Índice Geral

I.	Introdução	17
II.	Substâncias Neurotóxicas.....	19
1.	Classificação de Agentes Tóxicos.....	20
III.	Neurotoxicologia	21
1.	Tipos de Intoxicação	22
2.	Avaliação Neurotoxicológica.....	23
3.	Grandes Acidentes Tóxicos	25
IV.	Fisiopatologia Tóxica do Sistema Nervoso.....	26
1.	Mecanismos das Neurotoxinas	26
1.1.	Alterações nos mecanismos bioquímicos	27
1.2.	Perfis de lesão de neurotoxicidade	28
1.3.	Lesões/ agressões no Sistema Nervoso Central e Periférico	29
V.	Modelos de Avaliação de Neurotoxicidade	32
1.	Objetivo dos modelos de avaliação	32
2.	Importância do estudo dos modelos de avaliação de neurotoxicidade.....	32
3.	Exemplos de modelos de avaliação de neurotoxicidade	34
3.1.	Modelos de avaliação de atividade motora e sensorial~	34
3.1.1.	Modelo de Força de Preensão	34
3.2.	Modelos de Avaliação de Aprendizagem e Memória	35
3.2.1.	Modelo de Esquiva Passiva.....	35
3.2.2.	Modelo do Labirinto de Água de Morris	36
3.2.3.	Modelo de Alternância Espontânea	37
4.	Modelo do Labirinto de Água de Morris aplicado à Doença de Alzheimer.....	37
4.1.	Doença de Alzheimer e seus Sintomas.....	37
4.2.	Avaliação <i>in vivo</i> do Ácido Valpróico na memória usando ratos transgênicos	39
4.2.1.	Preparação do Modelo	41
4.2.2.	Procedimento do Teste.....	41
4.2.3.	Dia 1: Ensaio com Plataforma Visível	43
4.2.4.	Dia 1-4: Ensaio com plataforma escondida	44
4.2.5.	Dia 6: Número de viagens para o 3º quadrante	44

4.3.	Avaliação do Ácido Valpróico na memória em ratos transgênicos <i>in vitro</i>	45
4.3.1.	Quantificação de Placas Neuríticas	50
5.	Tetrahydrocannabinol e seus Défices Cognitivos.....	52
6.	Novos modelos de Avaliação de substâncias neurotóxicas	56
6.1.	Polímeros de Hidrogéis em modelos de tecidos 3D.....	56
6.2.	Modelos de tecidos neuronais	58
VI.	Conclusão	61
VII.	Bibliografia	63

Índice de Figuras

Figura 1: Lesões no neurónio.....	28
Figura 2: Efeitos neurológicos e comportamentais da exposição a produtos químicos neurotóxicos	31
Figura 3: Estimativa de pessoas afetadas por demência entre 2010 e 2050	38
Figura 4: Dr. Alois Alzheimer	38
Figura 5: Richard G.Morris	40
Figura 6: Labirinto de Água de Morris.....	41
Figura 7: Latência de escape	43
Figura 8: Latência de escape	44
Figura 9: Comprimento do caminho	44
Figura 10: Número de viagens	44
Figura 11: Tratamento de VPA e os seus efeitos nas placas neuríticas em ratinhos transgénicos com DA. Anticorpo monoclonal específico Ap 4G8.....	46
Figura 12: Tratamento de VPA e os seus efeitos nas placas neuríticas em ratinhos transgénicos com DA	48
Figura 13: Tratamento de VPA e os seus efeitos nas placas neuríticas em ratinhos transgénicos com DA. Anticorpo MAP-2.....	49
Figura 14: Quantificação de Placas Neuríticas	50
Figura 15: Vias de sinalização representativas envolvidas em atividades neuroprotectoras e de indução de neurogénese de VPA	51
Figura 16: Latência Média.....	54
Figura 17: Ensaio com Sonda	55
Figura 18: Modelos de tecidos em3D para uma ampla gama de campos de investigação	56
Figura 19: Modelos de tecidos em 3D	57

Índice de Tabelas

Tabela 1: Efeito de agentes tóxicos.....	20
Tabela 2: Exemplos de neurotóxicos e seus efeitos	Erro! Marcador não definido.
Tabela 3: Força de Preensão	34
Tabela 4: Esquiva Passiva.....	35
Tabela 5: Labirinto de Água de Morris	36
Tabela 6: Alternância Espontânea.....	37
Tabela 7: Sintomatologia da Doença de Alzheimer.....	39

Lista de Abreviaturas

A β – beta amiloide

Ach – Acetilcolina

ACHE – Acetilcolinesterase

APP – Proteína precursora amiloide

AP-1 – Proteína amiloide

BOF – Baterias de observação funcional

DA – Doença de Alzheimer

ECM – Matriz extracelular

GK3 – Quinase sintetase

HDAC – Histona desacetilase

MAP-2 – Proteína associada a microtúbulos 2

NIOSH – Instituto Nacional de Segurança Ocupacional e Saúde

PDH – Piruvato desidrogenase

PS1 – Presenilina 1

PS2 – Presenilina 2

SNC – Sistema nervosa central

SNP – Sistema nervoso periférico

THC – Tetrahydrocannabinol

VPA – Ácido valpróico

3D – Tridimensional

2D – Bidimensional

I. Introdução

A Toxicologia consiste numa área de estudo que analisa os efeitos nocivos de substâncias químicas (também de natureza física ou biológica) em seres vivos. Trata-se de uma matéria pluridisciplinar, sendo uma ciência que se ocupa de analisar múltiplas áreas, uma vez que abrange diversos conhecimentos como a farmacologia, a bioquímica, a química, a fisiologia e a patologia. (Gundert-Remy, Barth, B??rkle, Degen, & Landsiedel, 2015)

O interesse e âmbito da toxicologia aumentam diariamente e constituem-se em áreas da maior importância para o bem-estar do Homem e outros seres vivos. O crescimento constante do número de novos produtos químicos, produtos farmacêuticos incluídos, pesticidas, poluentes, drogas de abuso, aditivos alimentares, etc., associados à inerência do risco de toxicidade que acarretam, constitui o suporte e a justificação do empenho que deve ser dado a esta área de estudo.

O Homem é responsável pela produção de substâncias tóxicas (sintéticas) tais como: agroquímicos, fármacos, solventes usados na indústria; a natureza também contribui, em parte, para o seu desenvolvimento seja através de toxinas produzidas pelas bactérias, fungos, vírus, plantas e certos gases, constituindo fatores de risco para a saúde pública. Os danos que as substâncias químicas provocam na saúde do ser humano, dependem de uma série de fatores, a analisar, a toxicidade da substância assim como a sensibilidade do próprio indivíduo; de crianças, idosos, mulheres grávidas e pessoas portadoras de doenças crónicas que apresentam uma maior suscetibilidade aos seus efeitos comparativamente a adultos saudáveis. (Pinto, Silva, Bolzani, Lopes, & Epifanio, 2002; World Health Organization, 2011)

Com a constante evolução e o crescimento de indústrias químicas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento há a necessidade de analisar e controlar os vários fatores de risco. A toxicologia tem um papel importante na avaliação da segurança e dos riscos na utilização de substâncias químicas. É uma ciência que se ocupa em prevenir doenças e em proporcionar condições que visam a manutenção da saúde, bem-estar e qualidade de vida das pessoas.

A resposta da Indústria perante o desenvolvimento de novos produtos tem sido bastante favorável através da introdução de novas técnicas e/ou novos modelos computacionais, utilizados para avaliar características toxicológicas, assim como selecionar compostos que apresentem toxicidades inaceitáveis. Estas novas técnicas permitem estudar a estrutura de moléculas e assim prever o resultado antes mesmo de os compostos serem sintetizados.

O objetivo da toxicologia centra-se na avaliação do risco, sendo essencial estabelecer medidas de segurança na utilização dos compostos químicos assim como ter em conta a proteção dos indivíduos aquando de uma exposição.

Quando o órgão alvo de agressão tóxica é o sistema nervoso tem-se que a neurotoxicidade desencadeada pode contribuir para vários distúrbios mentais e neurológicos que se tornam imperativos de registar e controlar. Neste contexto, as desordens neurotóxicas constitui um fator de preocupação dos profissionais de saúde, originando uma atenção crescente para a organização da prevenção dos riscos de exposição a substâncias que atuem dessa forma. Assim, por exemplo, o uso de substâncias psicoativas (drogas) ou a exposição a fármacos durante um período prolongado constitui hoje um problema de saúde pública. (Oit, 2014; Pedroza, 2011; World Health Organization, 2011)

II. Substâncias Neurotóxicas

As substâncias neurotóxicas são aquelas que apresentam afinidade para o tecido nervoso, provocando alterações funcionais, por conseguinte, no presente sistema. Atualmente, o mundo em geral, enfrenta um grave problema que aumenta a passos acelerados diariamente: a introdução, não só na indústria, mas também no trabalho do dia-a-dia de um grande número de substâncias químicas com efeitos negativos não só no sistema nervoso central, mas também com efeitos em outros órgãos e sistemas do organismo.

O efeito destas substâncias sobre a saúde da população ativa é a preocupação atual na maioria dos países, uma vez que uma alta proporção de riscos ocupacionais a que os trabalhadores estão expostos corresponde precisamente a estas substâncias.

Por tudo isto, é necessário reconhecer um sistema que permita avaliar os danos sofridos por trabalhadores rotineiramente expostos a estes tóxicos e que são expressos em distúrbios do sistema nervoso e comportamento. (Uva & Faria, 2000)

Atualmente a intoxicação aguda por estes agentes está relacionada com o acidente ou suicídio, devido a exposições curtas, mas intensas sendo que geralmente excedem a tolerância do organismo.

No entanto o envenenamento crónico por essas substâncias, como resultado da exposição prolongada a baixas concentrações, provocam distúrbios neurotóxicos que são inicialmente expressos em mudanças sutis na função fisiológica e no comportamento do indivíduo, constituindo assim um desafio permanente para os toxicologistas. (Oit, 2014)

Sem dúvida, o diagnóstico destas desordens numa fase inicial é muito importante para a saúde dos trabalhadores, evitando a ocorrência de efeitos negativos, especialmente em termos de comportamento e da personalidade em indivíduos expostos.(Amorim, 2003)

O diagnóstico precoce permite separar o trabalhador do ambiente de trabalho e, por conseguinte, a exposição a substâncias tóxicas, evitando assim a progressão dos seus

efeitos negativos, nomeadamente lesões ou situações de incapacidade que o indivíduo apresentaria a longo prazo. (Preto, Paulo, Melo, Moreira, & Bisinoti, 2009)

1. Classificação de Agentes Tóxicos

A toxicidade pode resultar quer da ação de uma ação singular ou da interação de diferentes substâncias químicas entre si, ou seja podendo ocorrer um sinergismo. Trata-se de uma interação química entre diversos compostos químicos, que apresentam uma toxicidade mais elevada, quando comparada com a ação de cada composto químico isolado. (Kepner, 2004)

O composto químico, o tóxico, consiste numa substância exógena que quando entra em contacto com o organismo promove uma resposta/ação prejudicial originando um desequilíbrio quer num órgão ou num conjunto de órgãos lesões estruturais e/ou funcionais, podendo provocar até mesmo a morte.

A intensidade do agente tóxico é proporcional à concentração que apresenta assim como ao tempo de exposição necessitando por isso de estar acima de uma determinada concentração ou intensidade para que seja a suficiente para provocar uma ação nociva sobre o ser humano. As alterações que os agentes tóxicos originam no ser humano variam de acordo com o desenvolvimento e o estado de funcionamento do organismo. (Preto et al., 2009)

Tabela 1: Efeito de agentes tóxicos (Organização Mundial da Saúde, 2000)

Efeito	Exemplos
Mutagénico	Radiações ionizantes, raios x
Teratogénico	Talidomida, polifenóis biclorados e metais pesados, como o chumbo e arsénio.
Cancerígeno	Substâncias químicas presentes no fumo do cigarro, em alimentos e em poluentes ambientais. Radiações, metais pesados e vírus
Alergénico	Veneno de insetos
Asfixiante	Monóxido de carbono
Neurotóxico	DDT, formaldeído, dioxinas, chumbo, mercúrio e tolueno.

III. Neurotoxicologia

A neurotoxicologia, ciência que se ocupa de estudar os efeitos dos agentes tóxicos ao nível do cérebro e de todos os seus componentes celulares, tem vindo a crescer em resposta a preocupações levantadas por surtos neurotóxicos.

A neurotoxicidade define-se como qualquer efeito adverso que perturbe o normal funcionamento do sistema nervoso central ou periférico. Esta pode ser provocada por um agente biológico, químico ou físico que possui capacidades de alterar a integridade de um organismo. Os efeitos dos neurotóxicos ocorrem por uma ação direta ou indireta no sistema nervoso.

Atualmente é inserida como um componente de segurança ocupacional e ambiental, cada vez mais presente em programas de saúde. A exposição frequente a neurotóxicos estará na base do aparecimento, de um cada vez mais elevado número de doenças neuronais.

O ser humano possui um dos órgãos mais complexos e fundamentais, o cérebro. Sendo este responsável por inúmeras funções, destacando-se a comunicação com o meio exterior e a manutenção da homeostase. Uma complicação que ocorra ao nível do sistema nervoso pode resultar em consequências graves tais como paralisia, convulsões, falta de coordenação, demência. Outras lesões que possam ocorrer também no SNC podem resultar em efeitos neurocomportamentais e serem manifestados através de perda de memória, alteração na comunicação, perturbações na função cognitiva e motora, resultando numa perda de qualidade de vida do indivíduo. (Sharma et al., 2014)

Segundo o Instituto Nacional de Segurança Ocupacional e Saúde (NIOSH) (Antonio & Lacaz, 2003) os neurotóxicos representam um dos dez principais problemas na saúde ocupacional, em que trabalhadores, consumidores e pessoas expostas foram/são gravemente prejudicadas pela exposição a compostos industriais, altamente tóxicos para o sistema nervoso. (Rosa, Hodgson, Lunsford, & Jenkins, 2000)

1. Tipos de Intoxicação

Determinados compostos tóxicos atuam em zonas específicas, provocando lesões em outros sistemas para além do sistema nervoso.

Toxicologistas realizam testes em animais para avaliar se pequenas ou grandes doses de uma substância específica causam toxicidade. O teste designado por “Dose Letal ” é muitas vezes utilizado para descrever a potência de um composto tóxico, sendo que o DL_{50} é um indicador que corresponde à dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em estudo. (Nature Nanotechnology, 2011)

A diferença entre uma intoxicação aguda ou crónica são o nível e o tempo de exposição ao agente tóxico, tendo em conta as lesões e alterações provocadas pelos mesmos.

Quando ocorre uma intoxicação provocada por compostos tóxicos o indivíduo pode sofrer efeitos reversíveis ou irreversíveis, aquando dessa mesma exposição. Um efeito reversível trata-se de alterações ao nível funcional mas temporário que ocorre no sistema nervoso, as situações mais frequentes são acidentes com solventes ou pesticidas. Efeitos irreversíveis consistem em lesões permanentes envolvendo degeneração na célula nervosa, como estas sofrem pouca renovação as lesões que ocorram no sistema nervoso central são geralmente irreversíveis. (Viaene, 2002)

Tabela 2: Exemplos de neurotóxicos e seus efeitos (Moreira & Moreira, 2013; Peres, Moreira, & Dubois, 2003)

Substância	Fontes de exposição	Efeitos neurotóxicos
Mercúrio Metálico	Pesquisa de ouro, indústria elétrica e de cloro, solda, amálgamas	Distúrbios cognitivos, do equilíbrio, do movimento e neuropatia periférica
Metilmercúrio	Peixes, sedimentos	Distúrbios do equilíbrio, do movimento, visuais, auditivos e neuropatia periférica
Chumbo	Solda, fábricas de baterias e tintas, tintas à base de chumbo	Distúrbios cognitivos, do equilíbrio, do movimento e neuropatia periférica
Manganês	Indústrias de ferro e aço, soldas, fertilizantes	Distúrbios cognitivos, do equilíbrio, do movimento
Agrotóxico, Organofosforado	Inseticidas na lavoura, firmas de desinfestação	Distúrbios psiquiátricos, cognitivos e neuropatia periférica
Agrotóxico, Organoclorado	Inseticidas na lavoura, firmas de desinfestação	Distúrbios cognitivos e convulsões tônico-clônicas
Tolueno, Xileno e Estireno	Indústria de tintas e vernizes, borrachas, colas e de plásticos	Distúrbios cognitivos, do equilíbrio, do movimento e neuropatia periférica

2. Avaliação Neurotoxicológica

O estudo da Neurotoxicologia exige a aplicação de modelos ou baterias de diagnóstico que permitam de uma forma precoce realizar um diagnóstico abrangente e sistêmico, avaliando assim possíveis défices que os indivíduos expostos possam apresentar.

De um ponto de vista clínico, a avaliação dos possíveis danos, recorrendo por exemplo a testes neurofisiológicos, como seja, um eletroencefalograma, pode tornar-se inconsistente nas fases iniciais de determinadas doenças, no entanto pode também haver uma correlação entre marcadores bioquímicos e alterações funcionais nesta fase.

A avaliação neurotoxicológica permite pois conhecer o comportamento de substâncias neurotóxicas no corpo, assim como alterações anatomofisiológicas.

De um ponto de vista fisiológico o sistema nervoso central tem uma vulnerabilidade e sensibilidade particular à ação de produtos químicos.

Os mecanismos moleculares bioquímicos da toxicidade podem afetar as estruturas biológicas por mais de um processo em ambas as formas intra e extracelular, manifestando seletividade específica para determinados órgãos e sistemas.

Todas as células e tecidos de um ser vivo são suscetíveis aos efeitos nocivos de substâncias tóxicas, embora, na prática, se verifique que certos órgãos detetam mais intensamente a ação dessas mesmas. Por conseguinte, cada substância diferente tem um alvo tóxico para cada órgão específico.

O dano ao sistema nervoso central pode causar alterações sensoriais, tais como perda de visão, cheiro, etc., bem como distúrbios nas funções motoras do corpo e a capacidade do cérebro em integrar informações. Além disso, alterações que ocorram no sistema nervoso podem envolver distúrbios psicológicos.

As substâncias químicas são consideradas neurotóxicas se forem capazes de induzir um padrão consistente de disfunção neural ou alterações na estrutura química do sistema nervoso.

O neurónio é a unidade funcional do sistema nervoso, que consiste no corpo celular, e nas suas terminações designadas por dendritos e axónio. Os dendritos recebem informação excitatória ou inibitória através dos neurotransmissores.

As substâncias tóxicas atuam nos neurotransmissores interferindo com os processos de síntese de proteínas diminuindo a produção de neurotransmissores; os organofosforados podem inibir a acetilcolinesterase (ACHE), enzima responsável pela inativação de acetilcolina.

Os efeitos dos agentes neurotóxicos no sistema nervoso e em particular na neurotransmissão são determinados pela duração de exposição a que os recetores químicos são alvo. (Marrs & Maynard, 2013; Popoff & Poulain, 2010; West, 2006)

3. Grandes Acidentes Tóxicos

Em Detroit, Michigan, em 1934, (Boyes, 2001) muitos dos trabalhadores que trabalhavam com automóveis no processo da soldadura dos materiais, nomeadamente o chumbo, inalaram uma grande quantidade de gases de chumbo.

Registaram-se entre 2.700 a 4.000 casos de envenenamento por chumbo com sintomas que variavam entre problemas gastrointestinais a graves défices neurológicos, como encefalopatias e neuropatias periféricas.

Outro composto tóxico, que provocou a contaminação de alimentos, foi o metilmercúrio, utilizado na agricultura como fungicida.

Um acontecimento bastante presente na história do Iraque em que 459 pessoas morreram e mais de 6500 ficaram doentes. (Boyes, 2001)

Em 1956, na cidade piscatória de Minamata, no Japão, ocorreu o primeiro episódio de intoxicação epidémica que afetou uma grande área assim como um grande número de pessoas.

Concluiu-se que uma fábrica em Minamata utilizava compostos com mercúrio, estes resíduos eram libertados na água da Baía. Durante muitos anos foram feitas descargas nessa Baía, aumentando assim a sua concentração de mercúrio no organismo dos peixes.

Milhares de habitantes foram contaminados pelo consumo de peixe.

Os sintomas apresentados incluíam convulsões graves, perda de consciência e coma, acabando muitos por morrer.

(Amin-zaki, Majeed, Clarkson, & Greenwood, 1978; Harada, 1995; Skerfving & Copplestone, 1976; Swinburn, 2014)

IV. Fisiopatologia Tóxica do Sistema Nervoso

A toxicidade de determinados agentes tóxicos sobre o sistema nervoso, vai desencadear processos tóxicos segundo a sua localização.

As lesões ocorridas no sistema nervoso podem levar a alterações funcionais, tais como; alteração dos reflexos normais ocorrendo um bloqueio dos neurotransmissores inibitórios do arco reflexo (convulsões, hiper-reflexia); alterações da permeabilidade da membrana dos neurónios e inibição enzimática, assim como modificações na função sináptica, nomeadamente ao nível da acetilcolinesterase.

No sistema nervoso central ou periférico, as alterações que surgem podem ser de ordem crónica ou permanente. Estas caracterizam-se por uma necrose neuronal, podendo ser direta (alteração da síntese das proteínas neuronais) quando provocada por exemplo por organomercuriais ou indireta (anoxia) sendo o monóxido de carbono o agente causador. Ocorre de seguida uma desmielinização, ocorrendo uma alteração ao nível da transmissão no axónio. (Quinn et al., 2009)

1. Mecanismos das Neurotoxinas

Substâncias neurotóxicas atuam no tecido nervoso interferindo com os processos metabólicos do neurónio, afetando a capacidade da célula no fornecimento de nutrientes para a síntese de neurotransmissores e componentes celulares.

Dão-se alterações nas membranas dos axónios ou nos canais iónicos, interferindo com a ativação ou transmissão do potencial do axónio, necessário para estimular a libertação de neurotransmissores. Assim como, alterações na libertação, inativação ou recaptura de neurotransmissores na fenda sináptica, perturbando a transferência de informação para os neurónios pós-sinápticos. (“Neurotoxinas: y mecanismos de acción,” 2009; Rains, 2004)

1.1. Alterações nos mecanismos bioquímicos

Nas sinapses ocorrem:

1. Modificações nos níveis de neurotransmissores; ocorrendo um bloqueio na síntese e um aporte insuficiente de substâncias precursoras, deficientes níveis de enzimas sintetizadoras de catecolamina por depleção dos transmissores que contêm os botões sinápticos bloqueio da sua libertação
2. Interação do agente tóxico em contacto direto com o recetor. O agente tóxico contacta diretamente com os órgãos alvo assim como com os sistemas fisiológicos.
3. Substâncias tóxicas vão interferir com os nucleótidos cíclicos, modificando a sua síntese e destruindo-os

(Mayadevi, Archana, Prabhu, & Omkumar, 2012)

Nos axónios ocorrem:

1. Alteração da mielina
2. Desregulação do balanço iónico e energético, alteração dos canais iónicos. Os agentes tóxicos (como por exemplo o metanol) podem afetar a fosforilação oxidativa originando assim alterações na troca dos iões Na^+ e K^+ através da membrana e sua posterior recuperação do equilíbrio pela bomba de sódio.

(Saxena & Caroni, 2007)

1.2. Perfis de lesão de neurotoxicidade

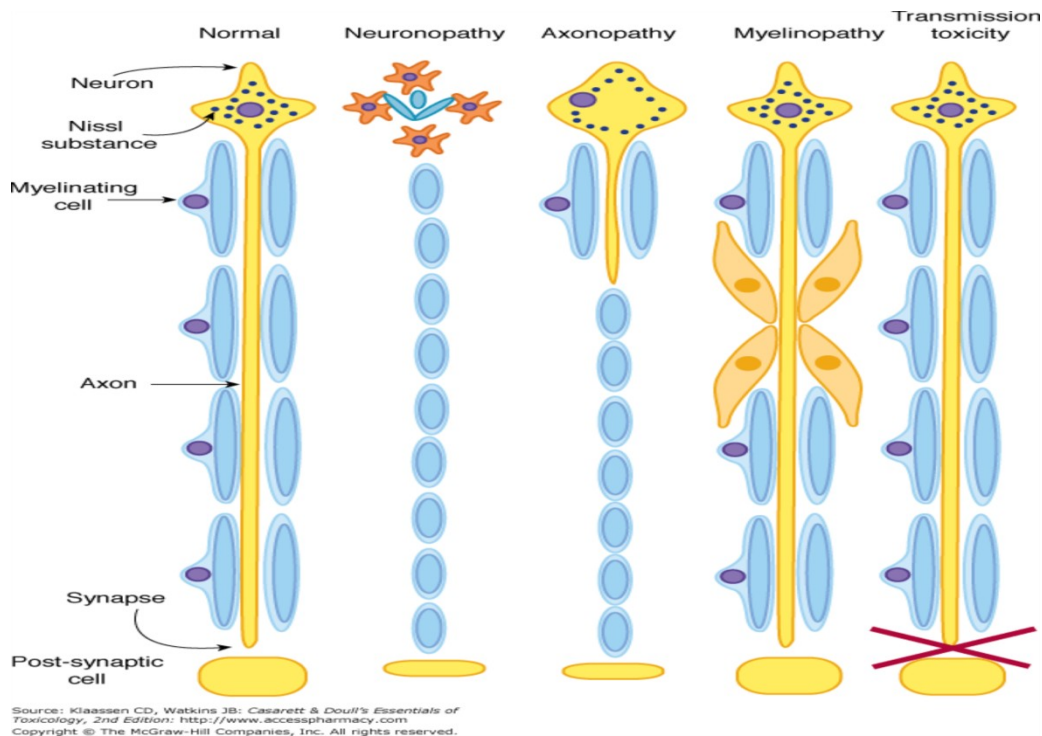


Figura 1: Lesões no neurónio (Toxic Responses of the Nervous System Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 2e, 2010)

Alguns tóxicos interferem com as células nervosas, ou têm afinidade por um tipo característico de neurónio, conduzindo assim a uma lesão ou mesmo à sua morte.

Uma neuropatia resulta de um distúrbio neurológico que afeta o funcionamento de todo o neurónio, levando à perda do mesmo, ocorre degeneração das suas extensões citoplasmáticas como seja, dendritos e axónios, assim como da camada de mielina, responsável por revestir o axónio. Os astrócitos perante uma perda neuronal proliferam, ocorrendo perda neuronal e gliose. Quando o axónio é o principal local de lesão, este degenera enquanto que no restante neurónio ocorrem apenas cromatólise e deslocação da substância de Nissl, do núcleo para a periferia celular. Condição denominada por axonopatia.

Axonopatias são doenças neurotóxicas cujo alvo de toxicidade é o próprio axónio. Este degenera assim como a mielina, permanecendo intato apenas o corpo celular.

São os axónios de longo comprimento que são mais afetados, possuindo mais alvos para sofrerem uma lesão tóxica em comparação com os de comprimento curto.

As consequências que ocorrem na degeneração ao nível do axónio do SNC e do SNP são diferentes, pois os axónios periféricos regeneram, não acontecendo o mesmo com os centrais.

Dependente da perturbação ocorrida, os axónios periféricos após uma degeneração, podem ser alvo de uma regeneração parcial ou mesmo completa.

Clinicamente, classifica-se por uma neuropatia periférica, estando a sensibilidade e a força muscular inicialmente comprometidas nas extremidades distais dos processos axonais, as mãos e os pés. (Llorens, 2013)

No que diz respeito à mielina trata-se de uma camada que reveste o axónio e, como tal é responsável por assegurar o isolamento elétrico dos processos neuronais

Mielinopatias podem resultar por um rompimento de mielina ou de uma lesão seletiva sob as células de mielina.

Células adjacentes dividem-se e cobrem o axónio rapidamente; ocorre uma remielinização, no entanto este processo é muito menos eficaz no sistema nervoso central do que no sistema nervoso periférico.

Muitos compostos tóxicos não conduzem à morte celular, contudo os seus efeitos tóxicos são transmitidos ao nível da neurotransmissão, interrompendo-a, seja através do bloqueio de excitação ou por estimulação excessiva. (Mayadevi et al., 2012; Traumatologia & Aparelho, n.d.)

1.3. Lesões/ agressões no Sistema Nervoso Central e Periférico

O tecido nervoso encontra-se distribuído pelo organismo, interligando-se e formando uma rede de comunicações, que constitui o sistema nervoso.

Todo o conjunto de sensações do indivíduo desde a fome, ao calor, ao sabor, cheiro e temperatura, entre outras, são reguladas pelo sistema nervoso.

O sistema nervoso é responsável por controlar todas as atividades reguladoras e coordenadoras, tendo a capacidade de reagir a estímulos externos, interpretando e respondendo a mudanças que surjam, para garantir sempre a homeostasia do organismo, o ponto de equilíbrio. Sendo este um sistema único e integrado, sendo este o centro do comando do corpo apresenta variadíssimas funções são estas: informação sensorial, integração, homeostase, atividade mental e controlo dos músculos e glândulas.

O sistema nervoso é constituído pelo sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é formado pelo cérebro e pela medula espinhal, sendo o local onde ocorre o processamento de informação e de envio de instruções. O SNP conduz os impulsos nervosos do cérebro para os diferentes órgãos.

Os nervos são como linhas de comunicação. Eles ligam todas as partes do corpo pela condução de impulsos do recetor para o SNC e deste para as glândulas e para os respetivos músculos. O sistema nervoso central recebe milhões de bits de informação de diferentes órgãos sensoriais. Integra a informação para determinar a resposta a ser executada pelo corpo. Informações são fornecidas para o sistema nervoso pelos recetores, que detetam variadíssimos estímulos tais como: toque, som, luz, dor, frio, calor, etc. Essas sensações podem causar uma reação imediata ou ficarem gravadas na memória. Essas informações são armazenadas no cérebro, ajudando a determinar reações em situações futuras.

Finalmente, o sistema nervoso regula várias atividades corporais através do controlo dos músculos do todo o corpo. Isso é chamado de resposta motora e inclui os músculos do esqueleto, os quais são responsáveis pelo movimento e pela flexibilidade dos órgãos internos, como o intestino. Outra função do sistema nervoso é o controlo da secreção de substâncias pelas glândulas.

A maior função do SNC é o de processamento de entrada de informações para que ocorra a resposta motora apropriada além de outro papel importante o de: seleccionar a informação, isto é, canalizar a região apropriada do SNC para dar a resposta desejada - se uma pessoa toca uma superfície quente, a resposta desejada é que retire a mão.

Dependendo da capacidade de penetração hematoencefálica dos agentes neurotóxicos assim se determina o tipo de lesão/agressão a regiões ou componentes celulares específicos do sistema nervoso.

De acordo com as propriedades típicas do tecido nervoso as diferentes respostas a esses agentes podem ser classificadas consoante os alvos celular e subcelular atingido.

São várias as manifestações clínicas, tais como: danos realizados ao nível do sistema nervoso periférico, incluem neuropatias periféricas, que se caracterizam por um distúrbio parestético nas extremidades, dormência e perda progressiva da coordenação devido à degeneração dos nervos motores ou sensitivos; danos que ocorram no sistema nervoso central, originam encefalopatias, que se manifestam em distúrbios da função neuropsicológica, alterações de humor e da personalidade, alucinações, diminuição da memória e da atenção, amnésia (envolvendo tanto a

memória de curta, como a de longa duração) fadiga e distúrbios visuais.
(Traumatologia & Aparelho, n.d.)

Sintomas Gerais:

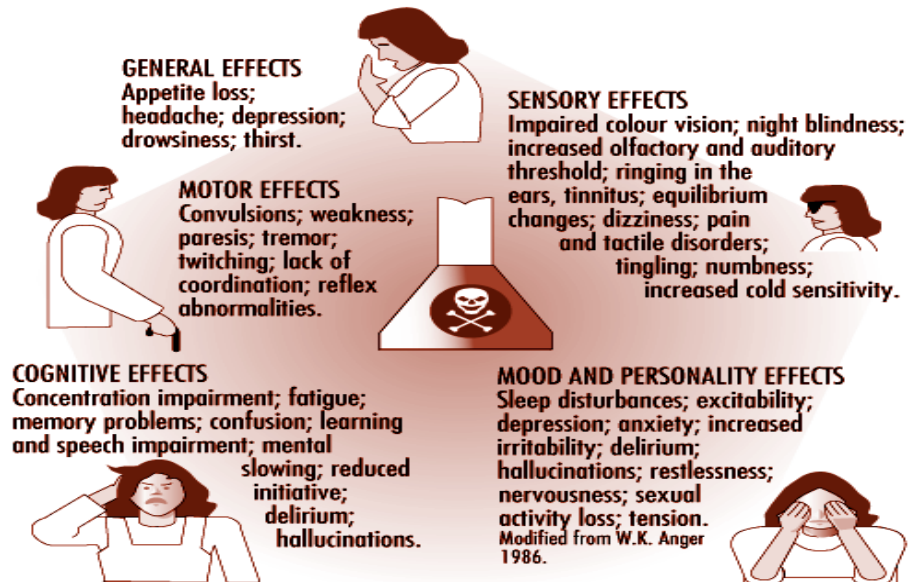


Figura 2: Efeitos neurológicos e comportamentais da exposição a produtos químicos neurotóxicos (www.ilocis.org/documents/chpt7e.htm)

V. Modelos de Avaliação de Neurotoxicidade

Com o desenvolvimento da ciência foi sendo cada vez mais necessário aperfeiçoar e desenvolver testes/modelos para conhecer e analisar os efeitos dos vários compostos tóxicos ao nível das funções neurológicas.

Através de experiências realizadas com animais em laboratório, foi possível conhecer melhor a toxicidade das várias substâncias químicas.

Os métodos são aplicados com todo o rigor científico, pois têm a finalidade de fornecer informações relativas aos efeitos tóxicos, avaliando principalmente riscos que possam ser extrapolados para o Homem.

A bateria de testes, baterias de observação funcional (BOF), são realizadas num único animal para avaliar todo o processo da lesão neurotóxica ao longo do tempo, sendo por isso modelos bastante vantajosos. (Boucard, Béat, Forster, Simonnard, & Froget, 2010; Horner et al., 2004)

1. Objetivo dos modelos de avaliação

Um dos objetivos dos modelos, na neurotoxicidade, consiste no lançamento de uma ampla rede de observações para detetar qualquer alteração que ocorra, por exemplo, por uma substância química que atue no sistema nervoso e para a qual não exista informação.

Nos testes de regulamentação, as BOF são utilizadas para fornecer informações em doses baixas. Estes dados são importantes, permitindo através de uma gama de testes de toxicidade, determinar o ponto final mais sensível. (Fonck, Easter, Pietras, & Bialecki, 2015; Markgraf, Cirino, & Meredith, 2010).

2. Importância do estudo dos modelos de avaliação de neurotoxicidade

Existe uma elevada importância na bateria de testes de triagem, assim como nos protocolos definidos, permitindo que ocorra uma boa experimentação, fornecendo informações mais específicas do que simplesmente designar um comportamento como “normal” ou “anormal”. Descrições de comportamentos são bastante informativas.

Na realização destes testes experimentais, para que não ocorram viés, o pessoal que o efetua deve desconhecer em absoluto qualquer tratamento que o indivíduo esteja a fazer (ensaio cego), para que os dados sejam os mais fidedignos e reais. Para isso, os observadores têm que ser ensinados, quanto aos conceitos básicos do projeto experimental, saber as boas técnicas de laboratório, conhecer quais os reportórios comportamentais normais e os fatores que o levaram a alterações.

A caracterização dos modelos de rato da doença humana é essencial para a compreensão da fisiopatologia subjacente e desenvolvimento de novas terapias. Muitas doenças são frequentemente associadas com mais do que um modelo, e por isso existe uma necessidade de determinar qual o modelo que melhor representa o estado da doença ou é mais adequado para a abordagem terapêutica sob investigação. (Boucard et al., 2010; Horner et al., 2004)

3. Exemplos de modelos de avaliação de neurotoxicidade

3.1. Modelos de avaliação de atividade motora e sensorial~

3.1.1. Modelo de Força de Preensão

Tabela 3: Força de Preensão (Freeman et al., 2000; Horner et al., 2004; Lin et al., 2014; Milić et al., 2012; Sci, 2015)

Caraterísticas	Vantagen s	Desvantagens	Aplicações
<p>As patas do ratinho são colocadas sobre uma rede de arame.</p> <p>O animal vai naturalmente segurar-se enquanto a cauda é suavemente puxada para trás.</p> <p>A força máxima da aderência antes de libertar a pega é registada</p>	<p>Rápido</p> <p>Fácil</p>	<p>Alta variabilidade na resposta</p> <p>A habituação pode levar a desmotivação, nas medições a curto intervalo de tempo</p> <p>Influenciado pela manipulação do cientista (precisa de treino)</p>	<p>Fenotipagem</p> <p>Doença de Parkinson</p> <p>Doença de Huntington</p> <p>Rastreio de drogas</p> <p>Envelhecimento</p>

3.2. Modelos de Avaliação de Aprendizagem e Memória

3.2.1. Modelo de Esquiva Passiva

Tabela 4: Esquiva Passiva (Moghadamnia, Hakiminia, Baradaran, Kazemi, & Ashrafpour, 2015; Nakagawa et al., 2009; Saadati, Babri, Ahmadiasl, & Mashhadi, 2010; Schneider et al., 2003; Stuchlík et al., 2013)

Caraterísticas	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<p>Câmara com dois compartimentos (escuro e claro). O ratinho recebe um choque suave na pata num dos compartimentos.</p> <p>Ratinho vai evitar entrar no compartimento onde tinha sido exposto ao choque.</p> <p>Medição pelo registo de latência para atravessar a porta entre os compartimentos</p>	<p>Teste ideal de 1ª triagem</p> <p>Não necessita que haja anteriormente uma privação de alimentos</p> <p>Simples de configurar e de usar</p> <p>Procedimento rápido para o estudo da memória de curto e longo prazo</p> <p>Ocorre inibição do comportamento</p> <p>Memória emocional e medo condicionado</p>	<p>Requer choques nas patas, sendo stressante para o animal</p> <p>Não consegue distinguir facilmente a memória contextual e a memória emocional</p>	<p>Analisar o efeito de novas substâncias químicas</p> <p>Estudar mecanismos cognitivos</p>

3.2.2. Modelo do Labirinto de Água de Morris

Tabela 5: Labirinto de Água de Morris (Barnhart, Yang, & Lein, 2015; Carter, Mifsud, & Reul, 2015; Chen et al., 2012; Gehring, Luksys, Sandi, & Vasilaki, 2015)

Caraterísticas	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<p>Grande piscina redonda com água com uma pequena plataforma escondida que está localizada 1-2cm abaixo da superfície da água.</p> <p>O rato é colocado na água e nadará ao redor até encontrar a plataforma para se sustentar.</p> <p>Estímulos externos são colocados ao redor da piscina para ajudar o rato, ensinando-o a localizar a plataforma</p>	<p>Memória espacial e memória não-espacial, memória de trabalho e referência</p> <p>Extremamente sensível a lesões no hipocampo e envelhecimento</p> <p>Não necessita que ocorra privação de alimentos</p> <p>Não há pistas de orientação de odor</p>	<p>Alterações na atividade locomotora podem interferir com as deslocções dentro de água</p> <p>Experiência de trabalho intensiva</p>	<p>Doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e Parkinson</p> <p>Efeitos do envelhecimento</p> <p>Efeitos de drogas de abuso</p> <p>Efeitos do álcool</p>

3.2.3. Modelo de Alternância Espontânea

Tabela 6: Alternância Espontânea (Deacon & Rawlins, 2006; Lalonde, 2002)

Caraterísticas	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<p>Aparelho com a forma de um T ou de um Y, apresentando um ponto de escolha com duas alternativas</p> <p>O rato começa na base do T/Y</p> <p>A recompensa pode ser colocada em um dos braços do labirinto ou recompensas diferentes podem ser colocadas em cada braço</p> <p>O rato terá que escolher o braço que pretende ir</p>	<p>Memória de trabalho espacial e não espacial</p> <p>Procedimento rápido</p> <p>Não necessita que antes haja privação de alimentos</p> <p>Simples de configurar e usar</p>	<p>Alterações na atividade locomotora podem interferir com a exploração do labirinto dos braços</p>	<p>Útil para avaliar a tendência ao inexplorado</p> <p>Dependência a opiáceos</p>

4. Modelo do Labirinto de Água de Morris aplicado à Doença de Alzheimer

4.1. Doença de Alzheimer e seus Sintomas

Em Portugal estima-se que a Doença de Alzheimer afete cerca de 10.000 pessoas. A nível mundial as estatísticas apontam para cerca de 44 milhões de pessoas com a doença ou com uma outra forma de demência, número este que tende a aumentar exponencialmente à medida que a população vai envelhecendo. (World Health Organization, 2002)

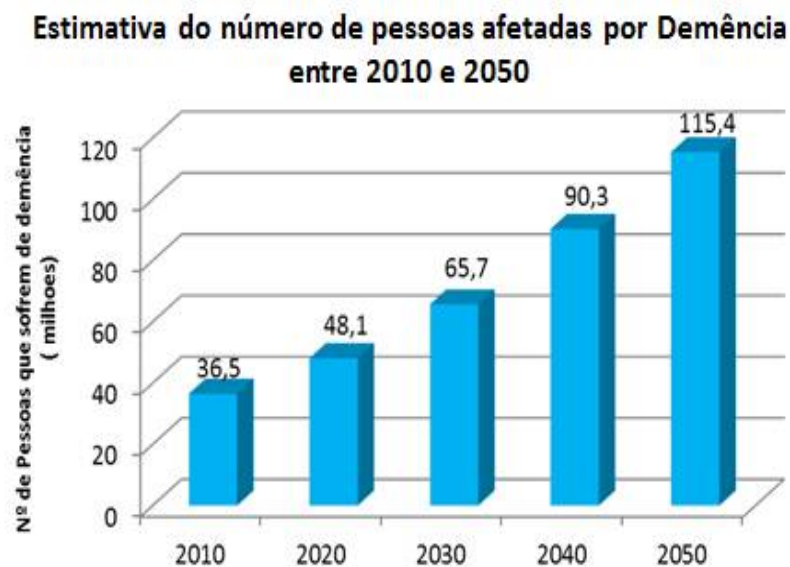


Figura 3: Estimativa de pessoas afetadas por demência entre 2010 e 2050 (Prince & Jackson, 2009; Who, 2012)

A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa progressiva, descrita em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Dr. Alois Alzheimer (1864-1915)

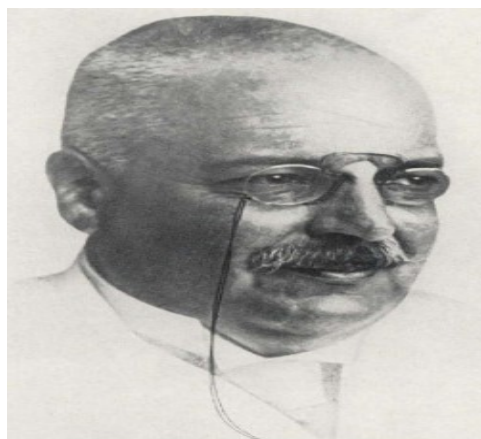


Figura 4: Dr. Alois Alzheimer (Vishal, Sourabh, & Harkirat, 2011)

A Doença de Alzheimer caracteriza-se por ser um tipo de demência que leva a alterações histológicas, nomeadamente à formação de placas senis e tranças neurofibrilares, originando uma deterioração progressiva das funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem, entre outras).

A formação de placas senis ocorre devido à deposição extracelular de agregados do peptídeo beta-amilóide (Ab). As tranças neurofibrilares correspondem a depósitos intracelulares em que está presente a proteína Tau hiperfosforilada.

Ocorre também alterações na transmissão sináptica, sendo notório a perda de memória e a diminuição progressiva de capacidades cognitivas.

Alterações no comportamento e sobretudo na capacidade funcional do indivíduo originam dificuldades na realização das suas tarefas diárias ou profissionais. (ADEAR Center, 2011)

Tabela 7: Sintomatologia da Doença de Alzheimer
(<https://www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/symptoms#learn>)

Fase 1 Fase Inicial	Fase 2 Alzheimer Brando Fase de diagnóstico	Fase 3 Alzheimer Moderado	Fase 4 Alzheimer Severo
Perda de memória	Agravamento da perda de memória	Agravamento da perda de memória e da confusão	Perda de peso
Dificuldade na comunicação /Esquecimento de palavras	Desorientação espacial	Incapacidade de aprendizagem e de lidar com novas situações	Infeções na pele
	Dificuldade e demora na realização de tarefas domésticas	Dificuldade em reconhecer familiares e amigos	Dificuldades na deglutição
	Alterações de comportamento como ansiedade e agressão	Agravamento na capacidade de comunicação	Incontinência
	Confusões com finanças pessoais	Alterações mais severas de comportamento	Convulsões
	Alterações na capacidade de decisões	Perda de controlo	Aumento do tempo de sono
	Perda da espontaneidade e iniciativa	Impossibilidade de realizar tarefas sequenciais	

4.2. Avaliação *in vivo* do Ácido Valpróico na memória usando ratos transgênicos

Richard G.Morris, como neurocientista, em 1981 foi o criador de um dos modelos de avaliação de neurotoxicidade, ao nível da função cognitiva, o Labirinto de Água de Morris.

O objetivo deste modelo era testar a aprendizagem ao nível do hipocampo, a aquisição de memória espacial e memória espacial a longo prazo.



Figura 5: Richard G.Morris (www.ccns.ed.ac.uk/people/academic/morris.html)

O modelo do Labirinto de Água de Morris desempenha um papel importante na confirmação e correlação de modelos de ratos nos distúrbios cognitivos ao nível da doença de Alzheimer. O desenvolvimento de medicamentos para a doença de Alzheimer é desafiado pelo sucesso em modelos animais testados no labirinto de Água de Morris.

O ambiente onde ocorre este modelo é bastante vantajoso uma vez que não há odores, sendo por isso um modelo bastante utilizado no estudo da neurobiologia e neurofarmacologia de aprendizagem espacial e memória. (Block, 1999)

Os estudos de toxicidade *in vivo* são dispendiosos, prolongados e estão envolvidas questões éticas com o uso de animais. Devido a esses fatores, os testes de toxicidade *in vitro* têm sido utilizados com mais frequência pela maioria dos investigadores.

Os ensaios *in vitro* apresentam como vantagens o de serem mais rápidos, convenientes e menos dispendiosos e acima de tudo não envolverem quaisquer questões éticas. No entanto, existem vários fatores que os ensaios *in vitro* não conseguem avaliar tais como as funções cognitivas, sensoriais e comportamentais. (Grandjean & Landrigan, 2014)

4.2.1. Preparação do Modelo

1. Utilização de uma piscina com um diâmetro de 150 centímetros com uma profundidade de 50 cm



Figura 6: Labirinto de Água de Morris

(www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=533_cat_id=4_Circular%20Pool.php)

2. Importante que o rato não veja o cientista durante o decorrer do teste.
3. Colocar pistas espaciais na sala ou no interior da piscina, acima da superfície da água

4.2.2. Procedimento do Teste

1. Colocar o rato na sala, para que este se adapte ao novo ambiente. Deixar pelo menos 30 minutos antes do teste.
2. Para iniciar o teste pegar o rato pela base da cauda, suavemente colocar o rato na água, de frente para a borda da piscina. Sair rapidamente da área de testes.
3. Se o rato encontrar a plataforma antes dos 60 segundos, permitir que o rato permaneça na plataforma durante 5 segundos. Se o rato não encontrar a plataforma, colocar o rato sobre a plataforma durante 20 segundos antes de voltar para a gaiola.
4. Colocar o rato em localizações de partida diferentes em cada nova tentativa.

(Qing et al., 2008)

Recorreu-se ao modelo do labirinto de Água de Morris para avaliar o efeito de hipóxia na Doença de Alzheimer assim como o efeito de um tratamento utilizado em ratinhos transgênicos com a Doença de Alzheimer, o ácido valpróico (VPA).

Investigadores demonstraram que a proteína beta-amilóide está fortemente relacionada com a doença de Alzheimer.

Trata-se de uma proteína solúvel que inicialmente circula de forma solitária, mas que ao longo da vida tende a formar agregados. É devido à sua solubilidade que esta consegue deslocar-se pelo cérebro livremente.

Ao longo do tempo, esta proteína tende a formar placas não solúveis, sendo uma das características da doença de Alzheimer.

Ocorre perda de sinapses, pontos de contato onde ocorre transmissão de informação entre as várias células nervosas, originando uma deterioração da função cerebral, especialmente a memória. (White et al., 2002)

Os principais fatores que contribuem para a doença de Alzheimer incluem o envelhecimento, aterosclerose, diabetes mellitus, acidente vascular cerebral o polimorfismo $\epsilon 4$ da ApoE, e menos educação. (Vermeer et al., 2003)

Histórias recentes de acidente vascular cerebral afirmam que estes aumentam a prevalência da doença de Alzheimer em pacientes idosos.

Os sintomas do doente que sofreu um enfarte cerebral mostram reduzido desempenho cognitivo assim como um agravamento da demência. (“Atherosclerosis and AD Analysis of data from the US National Alzheimer ’ s,” 2005)

A hipóxia é uma consequência direta da hipoperfusão, podendo desempenhar um papel importante na patogénese. (“Atherosclerosis and AD Analysis of data from the US National Alzheimer ’ s,” 2005)

4.2.3. Dia 1: Ensaios com Plataforma Visível

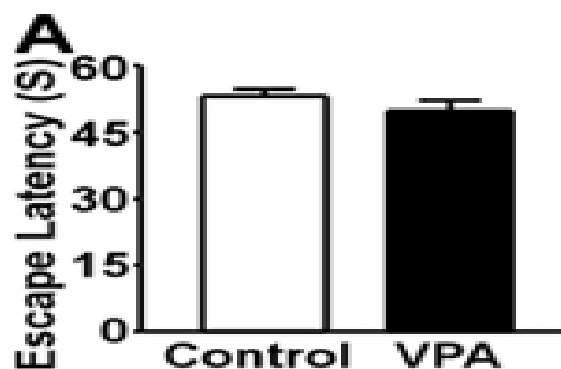


Figura 7: Latência de escape (Qing et al., 2008)

No primeiro dia não se registaram alterações em ambos os grupos (controle e grupo com tratamento de VPA) no que se refere à latência de escape, ou seja o tempo gasto no quadrante da plataforma para cada rato; assim como no comprimento do caminho, no ensaio de plataformas visíveis.

Assumimos assim, que os grupos apresentam atividade motora e capacidades visuais semelhantes. Estando aptos para observar pistas na piscina e no ambiente em redor assim como as plataformas que são sinalizadas. (Qing et al., 2008)

4.2.4. Dia 1-4: Ensaio com plataforma escondida

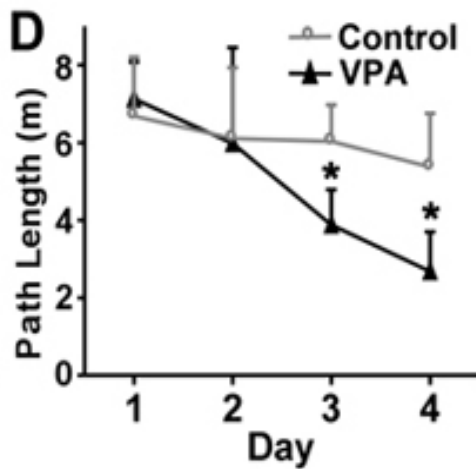


Figura 8: Latência de escape (Qing et al., 2008)

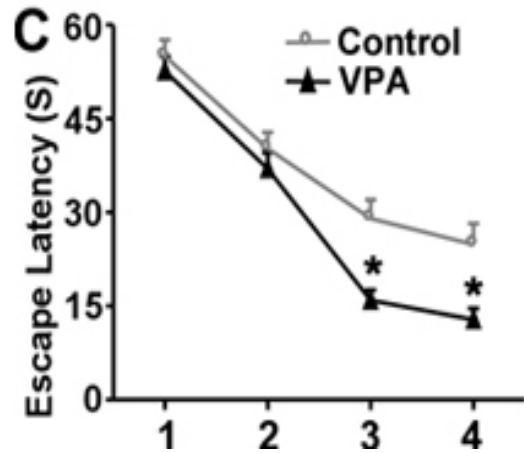


Figura 9: Comprimento do caminho (Qing et al., 2008)

Analisando os gráficos, os ratos que foram tratados com ácido valpróico (VPA) apresentam um desempenho mais significativo comparativamente ao grupo controle no decorrer do tempo. (Qing et al., 2008)

4.2.5. Dia 6: Número de viagens para o 3º quadrante

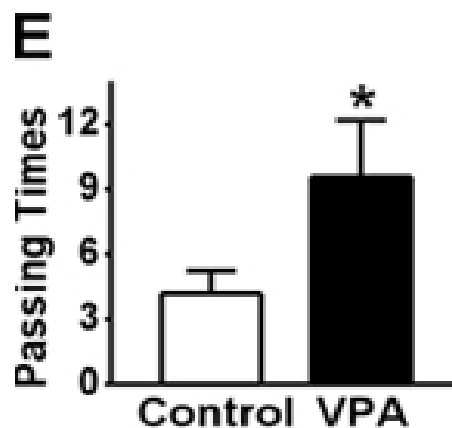


Figura 10: Número de viagens (Qing et al., 2008)

No dia 6, foi feito um ensaio que tinha como objetivo averiguar o número de viagens que o rato fazia para o terceiro quadrante, onde se encontrava a plataforma escondida.

Pode-se verificar que os ratos com o tratamento de VPA apresentam um maior número de viagens do que o grupo controle.

Relativamente ao fármaco VPA, através destes dados verificou-se uma notória melhoria nos défices de memória nos ratos transgénicos APP23. (Qing et al., 2008)

4.3. Avaliação do Ácido Valpróico na memória em ratos transgénicos *in vitro*

Os estudos toxicológicos *in vitro* têm como objetivo rastrear possíveis efeitos biológicos antes de recorrer aos ensaios *in vivo*, deste modo evita-se a utilização de um elevado número de animais.

Para compreender os mecanismos que levam ao desenvolvimento dos sintomas da Doença de Alzheimer, há que analisar os aspetos a nível celular.

As placas Senis são das lesões principais na DA, são placas extracelulares, formadas por fragmentos da clivagem incorreta da proteína precursora amiloide (APP). A clivagem incorreta desta proteína precursora ocorre devido a mutações nos genes das proteínas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2) responsáveis pelo aumento da proteína b-amiloide assim como na formação de placas neuríticas.

Placas amilóides, senis ou neuríticas, são depósitos insolúveis da proteína ou fragmentos dela, apresenta-se na forma tóxica chamada de beta-amilóide. (Sun, He, & Song, 2006)

Uma das funções do VPA é ativar sinais extracelulares regulados pela cinase, esta regula a função da proteína amiloide (AP-1) assim como mediar respostas neurotróficas, ou seja na produção de neurónios em determinadas áreas cerebrais, mais especificamente o hipocampo, interferindo deste modo com a memória. (Yuan et al., 2001)

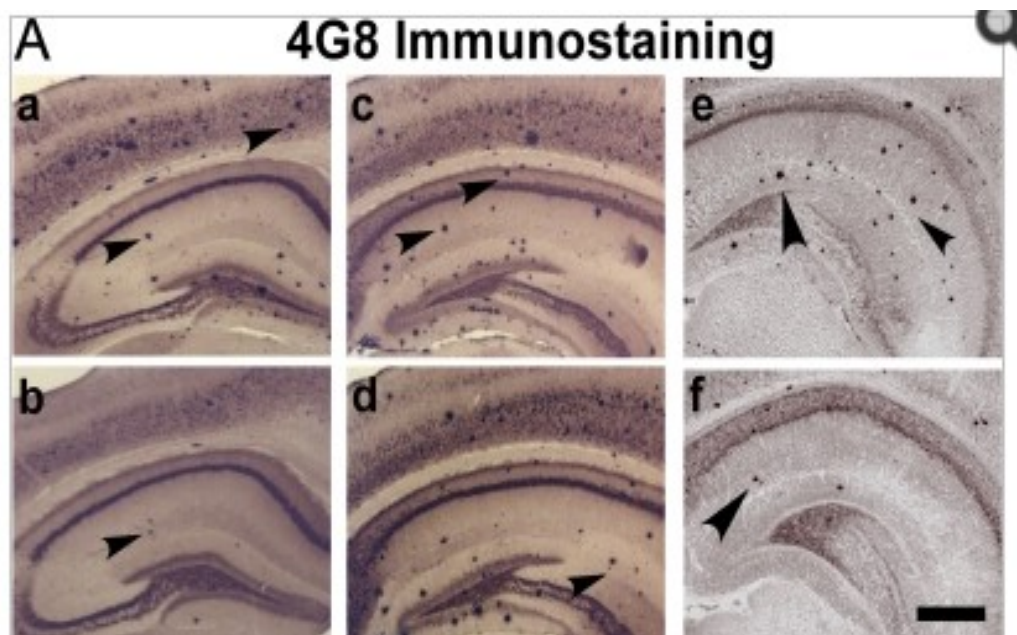


Figura 11: Tratamento de VPA e os seus efeitos nas placas neuríticas em ratinhos transgênicos com DA. Anticorpo monoclonal específico Ap 4G8 (Qing et al., 2008)

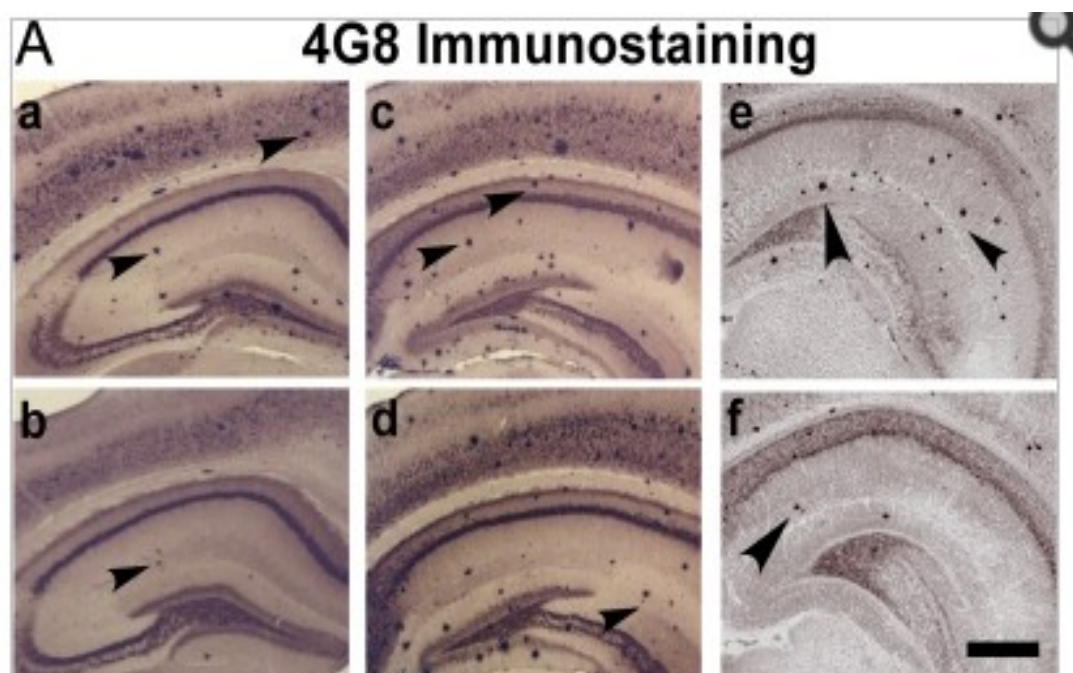
Os ratos transgênicos APP23 com 7 ou 9 meses de idade assim como os ratinhos duplamente transgênicos APP23/PS45 com 6 semanas de idade foram tratados com 30mg/kg de VPA, durante 4 semanas

Realizaram-se testes comportamentais e de seguida analisou-se o cérebro dos ratinhos por dissecação, onde foram seccionados.

Através de um anticorpo monoclonal específico Ap 4G8 e por métodos imunológicos, observaram-se as placas neuríticas.

Observa-se uma redução significativa no número de placas neuríticas em ratos que fizeram o tratamento com VPA comparativamente com os grupos de controlo.

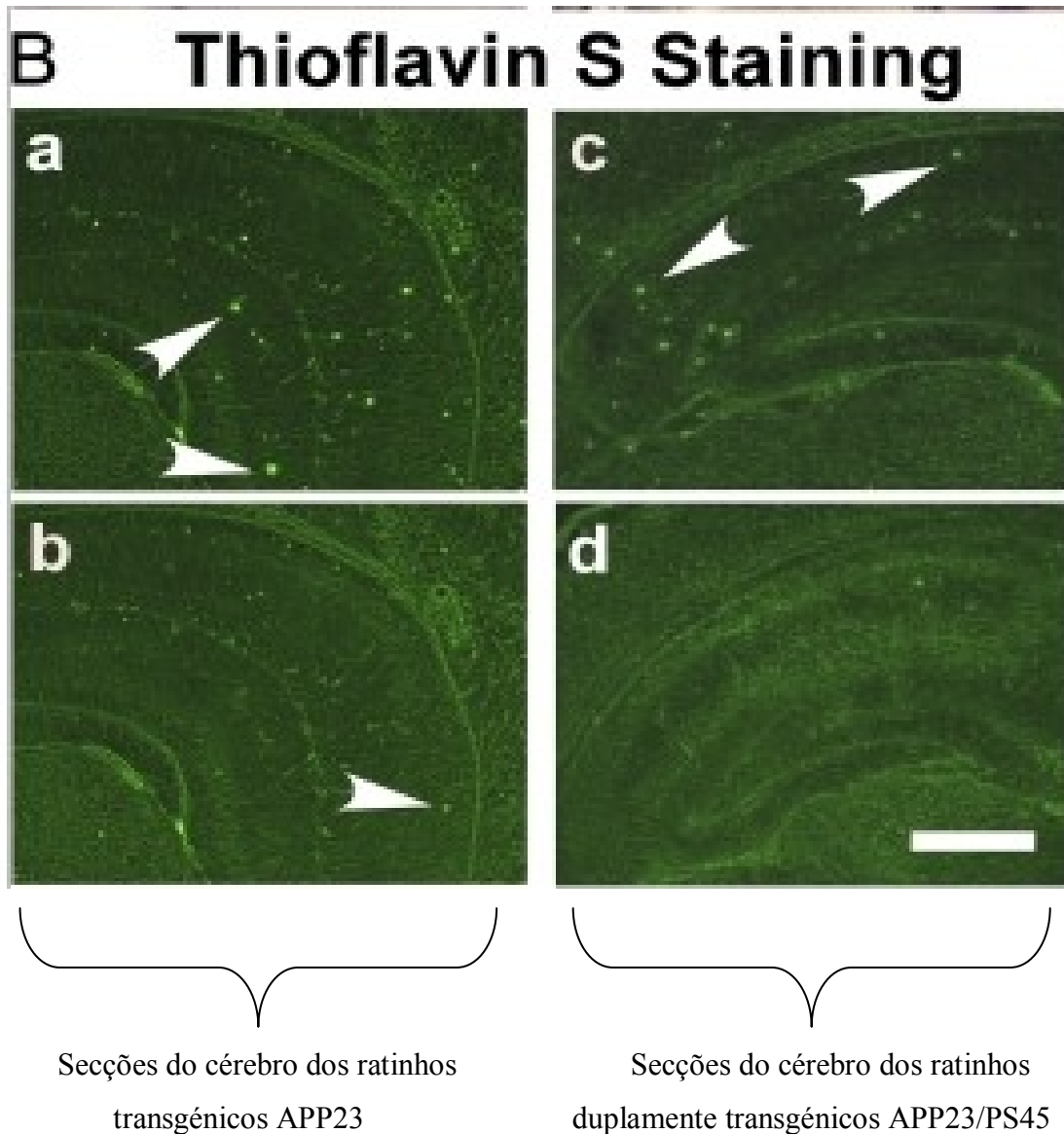
Grupos de controlo



Observam-se, respetivamente, as secções do cérebro do grupo de ratinhos transgénicos APP23 de 7 meses, do grupo de ratinhos transgénicos APP23 de 9 meses e dos ratinhos duplamente transgénicos APP23/PS45 que tiveram tratamento com VPA.

Significativamente mais placas neuríticas foram formados nos ratos com 9 meses em comparação com os ratos de 7 meses de idade; contudo o tratamento com VPA começando com a idade de 9 meses, poderá reduzir significativamente a formação de placas neuríticas. (Qing et al., 2008)

Figura 12: Tratamento de VPA e os seus efeitos nas placas neuríticas em ratinhos transgénicos com DA (Qing et al., 2008)



As placas neuríticas foram confirmadas pela utilização de coloração fluorescente de Tioflavina S, utilizado para identificar estruturas amilóides, estas são destacadas em pontos brancos.

Verificaram-se menos placas neuríticas em ratinhos tratados com VPA (b, d) comparativamente com ratinhos do grupo de controlo com a mesma idade (a, c)

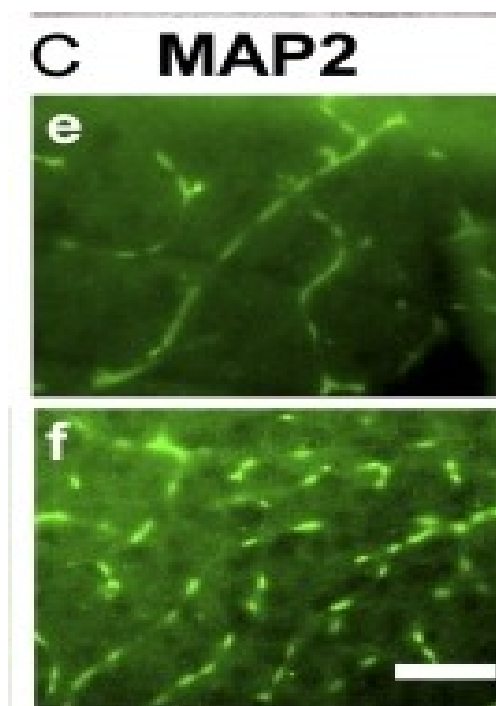


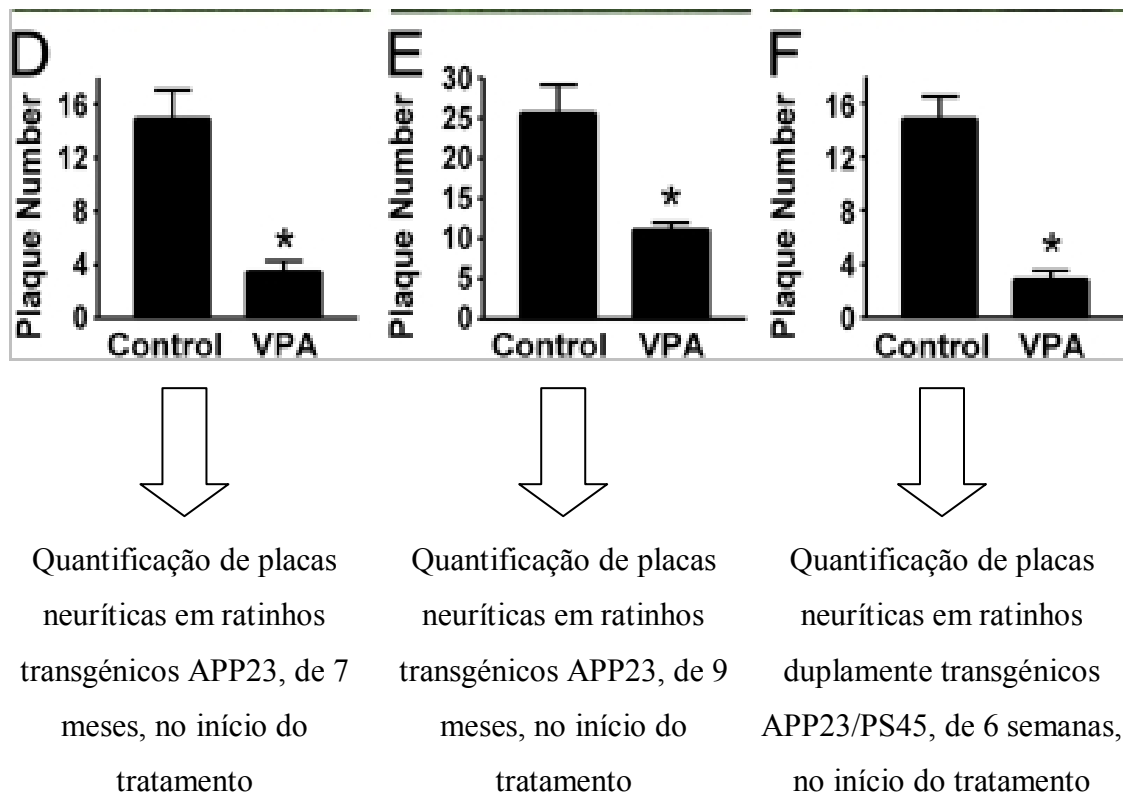
Figura 13: Tratamento de VPA e os seus efeitos nas placas neuríticas em ratinhos transgênicos com DA. Anticorpo MAP-2 (Qing et al., 2008)

As secções do cérebro de ratinhos transgênicos APP23 foram coradas com o anticorpo MAP-2. Anticorpo utilizado na identificação e demonstração de neurónios.

Ratinhos em que foram administrados VPA, ocorreu um aumento significativo no número de neurónios. MAP2-positiva. (Qing et al., 2008)

4.3.1. Quantificação de Placas Neuríticas

Figura 14: Quantificação de Placas Neuríticas (Qing et al., 2008)



O ácido de valpróico (VPA) é um dos tratamentos mais usados em doenças bipolares.

O VPA, assim como outros anticonvulsivantes, têm como função inibir os canais de sódio, potássio e cálcio. (Wilby et al., 2005)

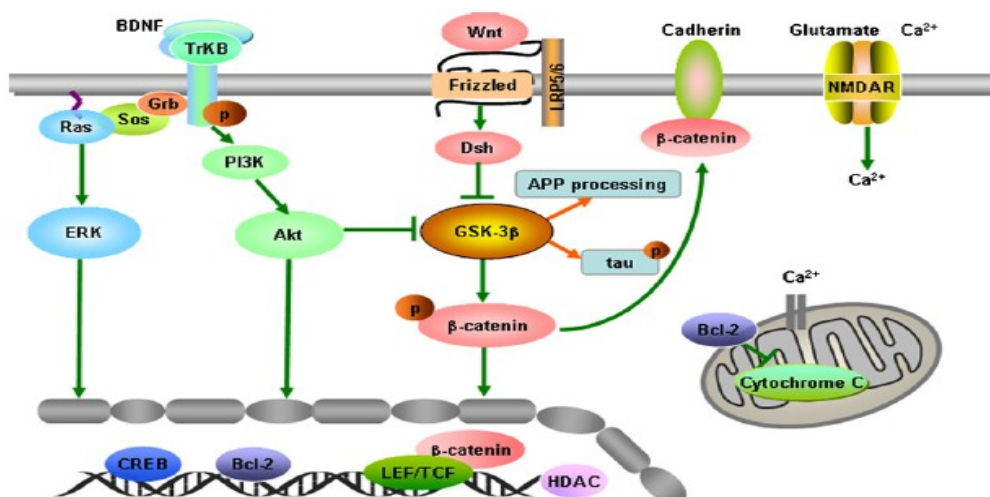


Figura 15: Vias de sinalização representativas envolvidas em atividades neuroprotectoras e de indução de neurogênese de VPA (adaptado de: Zhang, Li, & Zhang, 2010)

Alterações ao nível da quinase sintetase (GSK-3) e na atividade da histona desacetilase (HDAC) são alterações provocadas pelo tratamento de VPA (Williams, Cheng, Mudge, & Harwood, 2002)

GSK 3 está envolvida em um grande número de reações químicas de fosforilação regulatória de vários alvos celulares diferentes. O seu interesse começou devido ao desenvolvimento de estudos com animais, para estudar os mecanismos metabólicos, a neurodegeneração e a oncogénese.

Existem elementos que sugerem que a GSK 3 é responsável por estimulações apoptóticas, ativa e localiza os neurónios pré-emaranhados assim como os filamentos neurofibrilares no cérebro dos doentes com a doença de Alzheimer.

Os neurónios quando expostos à proteína amiloide, aumentam a atividade GSK3β, diminuindo os níveis de acetilcolina pela atividade do piruvato desidrogenase (PDH).

A inibição da GSK3 mediada pela PDH diminui a conversão do piruvato ao acetil CoA, um precursor para a síntese de acetilcolina (Ach). (Caberlotto et al., 2013)

Evidências sugerem que a GSK3 pode estar associada com diversos eventos adversos, nomeadamente à dinâmica dos microtúbulos, distrofia neurítica, emaranhados neurofibrilares (defeitos da proteína TAU, são estas que estabilizam os microtúbulos), plasticidade neuronal, défice cognitivo, neurodegeneração e um aumento da produção de amiloide, sendo estas algumas das características estudadas e são um papel chave na doença de Alzheimer.

De forma a melhorar a aprendizagem e memória, o aumento da acetilação das histonas por inibidores das histonas desacetilases (HDAC) pode ser um caminho terapêutico adequado para as doenças neurodegenerativas. (Baptista & Kang, 2007; Fischer, Sananbenesi, Wang, Dobbin, & Tsai, 2007)

Através de estudos, o VPA foi analisado em doenças neuropatológicas (DA) assim como ao nível comportamental, nomeadamente ao nível da memória.

Evidencia-se assim que o tratamento com VPA, inibe a GSK-3 β mediada pela γ -secretase na clivagem da APP *in vitro* e *in vivo*.

O tratamento com VPA em ratinhos indicou que pode ter efeito em fases precoces e tardias, no entanto ao nível das deficiências cognitivas estas só podem ser melhoradas se ocorrer uma intervenção na fase inicial. (Zhang et al., 2010)

Verificou-se que no modelo de ratinhos transgênicos com a doença de Alzheimer, ocorreu uma diminuição na produção da proteína amilóide, assim como na formação das placas neuríticas, os défices de memória foram atenuados neste modelo de ratinhos.

VPA é eficaz na terapia anti amilóide como um preventivo e no tratamento da Doença de Alzheimer, no entanto deverá ser aplicado nas fases precoces da doença. (Wang et al., 2014; Yao et al., 2014)

5. Tetrahydrocannabinol e seus Défices Cognitivos

Δ^9 -Tetra-hidrocanabinol (THC) é uma substância psicoativa, encontrada nas plantas do género Cannabis. É a terceira droga mais usada depois do tabaco e álcool e diversos estudos indicam que o seu uso de forma crónica, desencadeiam efeitos negativos nas funções cognitivas cerebrais. (Solowij, 2002; Tselnicker, Keren, Hefetz, Pick, & Sarne, 2007)

Foi demonstrado através de estudos recentes, que esta substância exerce uma dupla atividade, podendo, apresentar tanto efeitos neuroprotetores como neurotóxicos. Os canabinóides poderiam ser utilizados devido às suas propriedades neuroprotetoras, de forma a reduzir os danos cerebrais, como sejam os traumas mecânicos, a isquemia e excitotoxicidade. (Panikashvili et al., 2001; van der Stelt et al., 2001)

Esta hipótese foi confirmada através de estudos utilizando o modelo de ensaio com o Labirinto de Água de Morris que demonstraram que uma única administração de 0,001 mg/kg (doses com 3-4 ordens de grandeza menores que as doses convencionais) de THC afetaram o desempenho dos ratinhos 3 semanas mais tarde.

A hipótese sugere que uma dose elevada de drogas canabinóides apresenta efeitos neuroprotetores, quando é realizada dentro de um prazo curto.

Administrações de canabinóides de forma crónica induzem morte neuronal. (Y. Sarne & Keren, 2004)

O efeito neuroprotetor deve-se ao facto de anular os principais fatores responsáveis pela neurotoxicidade, retirando o cálcio dos canais de voltagem dependente, não ocorrendo a libertação de glutamato. (Mackie & Hille, 1992; Shen, Piser, Seybold, & Thayer, 1996)

O efeito neurotóxico ocorre em concentrações mais baixas de canabinóides pois favorecem a entrada de cálcio nas células. (Rubovitch, Gafni, & Sarne, 2002; Yosef Sarne, Asaf, Fishbein, Gafni, & Keren, 2011)

O objetivo do estudo foi testar se uma dose ultra-baixa de THC induz alterações cognitivas de longa duração em ratinhos.

Para isso, utilizaram-se ratinhos ICR do sexo masculino com 8-12 semanas, os quais foram injetados intraperitonealmente uma solução de Δ^9 -Tetra-hidrocanabinol a partir de uma solução de 100 mg/ml em etanol, os ratinhos de controlo foram injetados com uma solução veículo.

O modelo de estudo de avaliação consistiu no Labirinto de Água de Morris, utilizou-se uma piscina circular (140 cm de diâmetro, 51 cm de altura) com água à temperatura de 23 ± 2 °C, uma plataforma transparente estava colocada 0,6 cm abaixo da superfície da água. O processo realizava-se numa sala que fornecia pistas visuais e para além destas foram adicionadas pistas nas paredes internas da piscina.

Mediu-se o tempo de latência, o tempo que levou o ratinho para encontrar a plataforma. O tempo estabelecido são 120 segundos para encontrar a plataforma e ficar nesta durante 30 segundos, caso o rato não encontre a plataforma no tempo estabelecido, o mesmo é levado para a plataforma e é autorizado a permanecer durante 30 segundos, sendo de seguida, removido da piscina.

O ensaio consiste em cada ratinho nadar quatro vezes por dia, durante quatro dias consecutivos, em dois blocos de ensaios por dia, que manifesta-se em dois ensaios de natação.

No último dia de ensaio, a plataforma foi removida e assim avaliou-se o número de passagens acima do local onde a plataforma tinha estado antes. O ratinho foi deixado a nadar durante 45 segundos.

As curvas de aprendizagens foram analisadas com base em experiências realizadas *in vitro* tendo por base analisar o efeito duplo dos canabinóides e os seus resultados a nível comportamental. (Rubovitch et al., 2002)

Experiências demonstraram que uma injeção de 10 mg/Kg de THC induz no ratinho os seguintes sintomas: hipotermia aguda, analgesia e diminuição da atividade motora.

A injeção com 0,001 mg/Kg provocou os seguintes efeitos, elevação da temperatura corporal, potenciou a resposta a estímulos nocivos e aumentou a atividade motora.

Doses baixas de THC foram utilizadas para estudar os efeitos a longo prazo de uma concentração de THC nas funções cognitivas em ratinhos enquanto doses mais baixas foram analisadas para estudar a aprendizagem espacial e memória passado 3 semanas após a injeção com a substância psicoativa. O tempo estabelecido foi de 3 semanas para que não houvesse qualquer influência de resíduos de fármaco.

Foram realizados quatro experiências para evidenciar algum comprometimento motor e ambos os grupos (grupo de controlo e grupos de injeção de THC) não apresentaram evidências significativas, no entanto foram detetadas diferenças significativas nas curvas de aprendizagem em relação aos ratos injetados com THC a curva era mais rasa e as latências de escape foram mais longas nos dias 3 em comparação com os ratinhos que foram injetados com veículo. (Tselnicker et al., 2007)

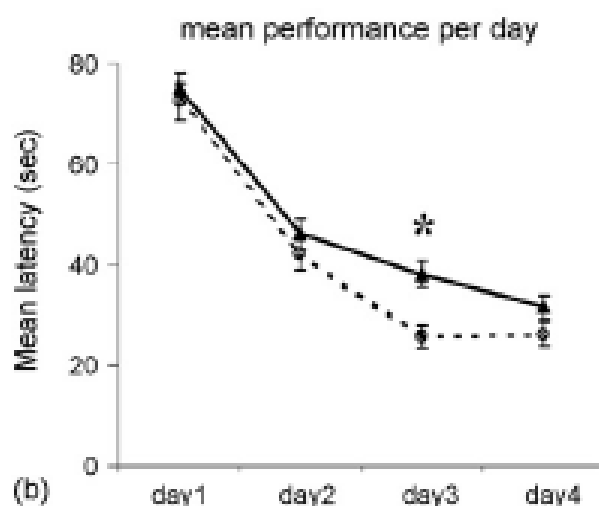


Figura 16: Latência Média (Tselnicker et al., 2007)

No teste final das sondas, avaliou-se o número de cruzamentos com o local onde tinha estado a plataforma.

O grupo injetado com THC apresentou uma pontuação mais baixa (2,95) comparativamente ao grupo de controlo (2,05).

A eficiência na aprendizagem e memória induzida por THC foi reduzida, mas reprodutível.

O efeito do THC no teste do Labirinto de Água de Morris, provocou uma desaceleração na aquisição da tarefa. (Tselnicker et al., 2007)

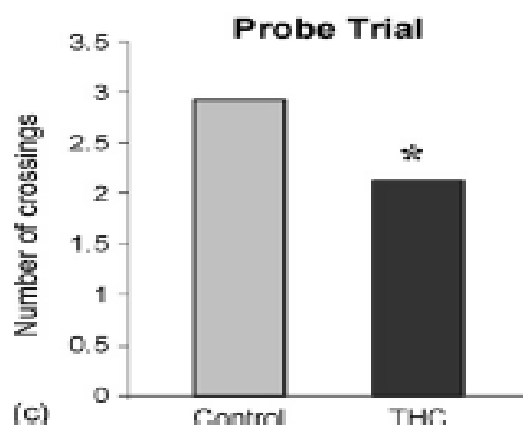


Figura 17: Ensaio com Sonda (Tselnicker et al., 2007)

Na análise dos défices cognitivos, verificou-se que 4 meses a seguir à injeção de uma única dose de 0,001 mg/Kg de THC, os ratinhos apresentaram um menor desempenho no teste de Labirinto de Água de Morris, embora estatisticamente não tenha sido significativo.

Podemos constatar que uma única injeção de uma ultra-baixa dose de THC para ratinhos pode ter efeitos negativos nas suas funções cognitivas por um tempo prolongado.

Constata-se que uma dose elevada de canabinóide administrada antes ou depois de uma lesão irá ter funções neuroprotetoras.

Tratamentos crónicos com canabinóides podem causar défices cognitivos devido à exposição do cérebro a pequenas concentrações do fármaco lipofílico por um tempo prolongado.

Através de uma ressonância magnética funcional (fMRI) os utilizadores de canabinóides podem compensar défices cognitivos sutis, no entanto há que ter em consideração o potencial terapêutico das drogas canabinóides a longo prazo. (Herring, Schaefer, Gudelsky, Vorhees, & Williams, 2008; Jager, Kahn, Van Den Brink, Van Ree, & Ramsey, 2006; Y. Sarne & Keren, 2004)

6. Novos modelos de Avaliação de substâncias neurotóxicas

6.1. Polímeros de Hidrogéis em modelos de tecidos 3D

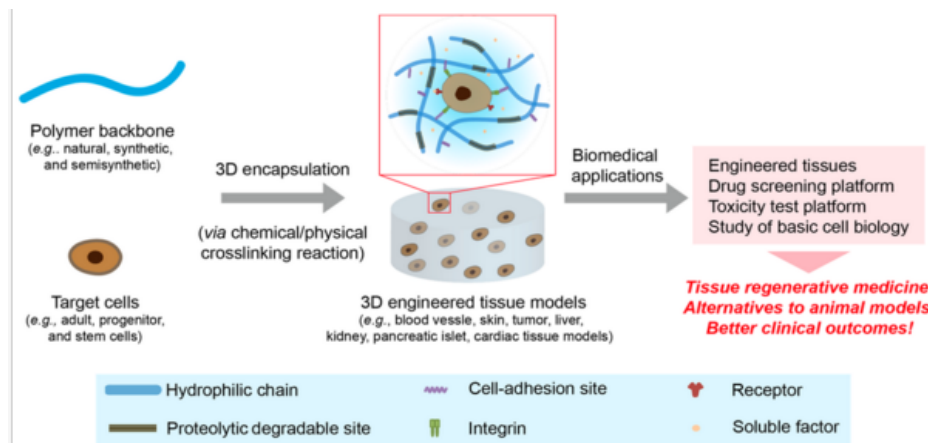


Figura 18: Modelos de tecidos em 3D para uma ampla gama de campos de investigação. (Park & Park, 2016)

Os modelos de células em 3D são formados por encapsulação de células alvo, através de reações de reticulação.

Estas sofrem um encapsulamento dentro de hidrogéis e são uma técnica que consiste em apresentar um ambiente que melhor representa as condições *in vivo*, tornando-se assim uma técnica bastante importante na cultura de células no desenvolvimento de construção de tecidos.

Hidrogéis poliméricos sintéticos são redes de inchaço-água que podem ser desenvolvidas para se tornarem estáveis, nas matrizes de hidrogel, são incorporadas zonas proteolíticas, através de mecanismos de hidrólise ou proteólise para se degradarem, porções de adesão celular e moléculas que ligam os fatores de crescimento, necessário para suportar o crescimento celular dentro das matrizes. São vários os polímeros a serem estudados para serem aplicados tais como poli (etileno glicol) e ácido hialurônico.

Contudo, o polímero torna-se mais funcional com grupos que sejam reativos tais como metacrilatos ou acrilatos, composto que são capazes de sofrer reticulação por diversos mecanismos. (Park & Park, 2016)

Recentemente, os polímeros de hidrogéis têm sido largamente utilizados em investigações, tais como na medicina regenerativa, biossensores e em sistema de detecção de drogas (Manuscript, 2010; Seliktar, 2012; Tomatsu, Peng, & Kros, 2011)

Matrizes extracelulares (ECM) são importantes no crescimento celular, diferenciação e migração para os tecidos de origem.

São constituídas por proteínas estruturais, polissacarídeos e por fatores solúveis.

Estes modelos de tecidos em 3D apresentam semelhanças com os ECM, criando-se microambientes extracelulares artificiais em 3D. (Manuscript, 2010)

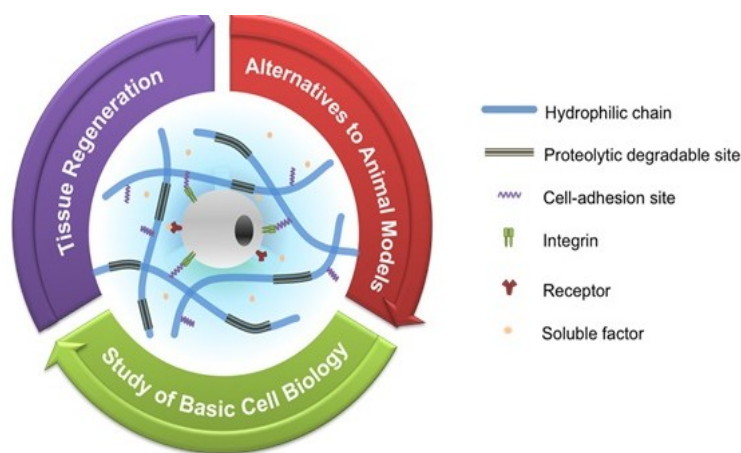


Figura 19: Modelos de tecidos em 3D(Park & Park, 2016)

Como vantagem este tipo de modelo apresenta uma alternativa aos modelos animais e em modelos de cultura tradicionais 2D de testes de toxicidade, em testes de eficácia de um fármaco, assim como em testes de triagem aplicados em tecidos saudáveis e patológicos. (Francia & Kerbel, 2010)

Novos modelos de estudo de cultura de células de mamífero são cada vez mais necessários e úteis no estudo da sua fisiologia celular.

Atualmente a medicina regenerativa procura modelos inovadores ao nível dos tecidos de substituição e em crescimento.

A cultura de células bidimensionais (2D) tem sido bastante utilizado na cultura de células *in vitro*, no entanto descobriu-se novos estudos que demonstraram que as células comportam-se na sua forma mais natural, nativa quando cultivadas em ambientes tridimensionais.

Na cultura celular tridimensional (3D), recorreu-se ao uso de hidrogéis sintéticos e naturais.

Os hidrogéis sintéticos incorporam sinais bioquímicos e os hidrogéis mecânicos são utilizados para simular uma matriz extracelular nas suas condições originais.

A cultura de células de mamíferos *in vitro* permitem estudar a fisiologia celular assim como as suas fisiopatologias, recorrendo a métodos bidimensionais (2D). Trata-se de um método feito por uma cultura de populações de células individuais em substratos bidimensionais (2D), esses substratos utilizados são polistireno para cultura de tecidos ou uma superfície de análogos de tecido.

Experiências efetuadas com modelos de estudo bidimensionais são utilizados para compreender e interpretar a base de fenómenos biológicos complexos.

Estudos *in vitro* demonstram que normalmente as células muitas vezes exibem um comportamento não natural quando estas são cortadas a partir de tecidos de origem tridimensionais (3D) e confinados apenas a uma monocamada. (Engler, Rehfeldt, Sen, & Discher, 2007)

6.2. Modelos de tecidos neuronais

Um outro estudo em desenvolvimento e bastante promissor é o desenvolvimento de um designado “cérebro humano”. Trata-se de estruturas de pequenas dimensões com neurónios, células de vasos sanguíneos que são organizadas de forma que se assemelhe a um cérebro humano de reduzidas dimensões.

A utilização destes organelos são importantes na medida que permitem testar a toxicidade de variadas substâncias.

O ser humano está rodeado de substâncias químicas e artificiais, das quais interage diariamente, tais como, substâncias poluentes, compostos químicos inseridos nos alimentos, entre outros compostos que têm um efeito negativo sobre a saúde do Homem.

Uma equipa de investigadores, a partir de células estaminais humanas, desenvolveu os organelos, que se assemelham em parte à complexidade do cérebro humano. Através destas estruturas, consegue-se assim identificar a neurotoxicidade das várias substâncias.

Muitos dos modelos atuais que são usados para avaliar e testar os fármacos, apresentam taxas de sucesso baixas, pois muitos dos efeitos de toxicidade não tinham sido identificados durante os testes realizados em animais.

Com o desenvolvimento e a evolução das indústrias, são mais as substâncias químicas a que o Homem está exposto, sendo uma preocupação bastante presente sobre quais os seus efeitos na saúde mental. O cérebro é um órgão bastante sensível a agressões tóxicas, principalmente durante o seu desenvolvimento, é de extrema importância assim analisar e estudar novos modelos para que possamos, de certa forma, prevenir e conhecer os seus efeitos.

Para contornar algumas das limitações dos modelos atuais para testar a neurotoxicidade, criaram-se organelos através de diferentes características de células humanas no cérebro.

Estes modelos de tecidos neuronais vão apresentar características semelhantes à fisiologia humana, sendo modelos mais fidedignos para prever a toxicidade em comparação com os modelos animais.

Este modelo consiste numa matriz de gel, onde a partir de células estaminais humanas, se produzem as células necessárias e úteis para se colocarem na matriz de gel. A obtenção de células a partir de células estaminais humanas é devido ao facto que é durante o desenvolvimento do embrião que estas têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos de células.

A sequência utilizada pelos investigadores foi colocar células progenitoras de células nervosas, células vasculares (responsáveis por formar os vasos sanguíneos) e por fim as células progenitoras da glia, que consiste num tecido que é responsável por dar suporte às células nervosas. Desta forma os tecidos vão sendo construídos passo a passo, até se obterem os organelos necessários.

Realizaram-se diferentes testes com a aplicação de um elevado número de substâncias químicas, nos diferentes nos organelos, sendo que certas substâncias eram neurotóxicas e outras não.

Através de um programa de computador que previa a neurotoxicidade de uma substância, obteve-se um perfil que indicava qual era a reação dos organelos às substâncias tóxicas.

No entanto é um modelo ainda em estudo, ainda experimental, é necessário aperfeiçoá-lo e analisar todas as características que um cérebro possui, nomeadamente a barreira hematoencefálica, sendo um fator a estudar pois impede que muitas substâncias não passem do sangue para o tecido nervoso.

É importante através de novos estudos de modelos que haja uma complementação com os modelos tradicionais para assim alcançar testes eficazes. (Bae et al., 2010; Chambers, Mica, Studer, & Tomishima, 2011; “in Silico,” 2014)

VI. Conclusão

Os modelos de avaliação de área da toxicologia são múltiplos, é um universo muito grande, tratando-se de áreas sempre em constante evolução e mudança.

As metodologias disponíveis para a identificação dos efeitos comportamentais de uma exposição são apenas um dos aspetos que se devem ter em conta na estratégia de avaliação da exposição a substâncias químicas.

É importante ter em consideração outros fatores que contribuem para a expressão da neurotoxicidade comportamental e cruzar com dados de estudos neuroquímicos, de neurofisiologia e neuropatologia, para se obter uma correta avaliação do risco.

Por ser uma área em grande expansão, atualmente, muitas questões toxicológicas não são totalmente esclarecidas.

Nesta monografia foram dados a conhecer alguns modelos de avaliação que existem ao nível da atividade motora e sensorial, assim como das funções cognitivas, nomeadamente a aprendizagem e memória.

De entre uma diversidade de modelos existentes, realçaram-se particularmente os modelos de avaliação das funções cognitivas, tal como, o modelo do Labirinto de Água de Morris sendo um modelo bastante específico para avaliar os efeitos das doenças neurodegenerativas, destacando-se a Doença de Alzheimer, assim como o efeito do tratamento de um fármaco ao nível desta neuropatologia.

Foram apresentados estudos *in vivo* e *in vitro* realizados em ratos controlo e transgénicos. Testes comportamentais foram realizados nos ratos transgénicos mais velhos (9 meses), tratados com o fármaco ácido valproico.

Apesar de se observar uma diminuição significativa na formação das placas neuríticas, contudo não houve diferenças significativas na latência de escape e no comprimento do percurso, nos ensaios de plataforma escondida entre os grupos de tratamento e de controlo, embora nos ratos duplamente transgénicos, expostos ao tratamento com VPA, se tenha verificado um ligeiro melhor desempenho nos testes de plataforma escondida.

Os testes *in vitro* demonstraram a eficácia do tratamento com VPA em fases iniciais e tardias, contudo após uma deficiência cognitiva este tratamento não é eficaz, só atuando nas fases precoces da doença, melhorando-as.

Um outro estudo apresentado, utilizando o mesmo modelo de avaliação, Labirinto de Água de Morris, foi realizado com uma substância psicoativa, Δ^9 -Tetra-hidrocanabinol, para testar a relação entre doses ultra baixas de THC e os seus défices cognitivos a longo prazo em ratinhos.

Vários estudos estão ainda a ser realizados em modelos animais, para analisar os efeitos de uma dose baixa de THC no ser humano e as suas propriedades neuroprotetoras e neurotóxicas. É de notar que doses administradas por um longo período de tempo, têm efeitos significativos nas funções cognitivas, provocando alterações ao nível da memória e aprendizagem.

Os testes realizados em modelos animais, por vezes podem tornar-se incoerentes ou insuficientes, mesmo que o funcionamento do organismo seja idêntico, uma vez que podem ocorrer determinadas reações a substâncias ou determinados fatores que se manifestam de forma específica em cada unidade experimental, impedindo assim que certos dados e informações possam ser extrapoladas. Assim, há uma necessidade constante de investigar novos modelos de avaliação de substâncias neurotóxicas. O modelo de tecidos em 3D e os modelos de tecidos neurais são modelos recentes e inovadores, e constituem um modelo alternativo ao modelo com animais.

Possuem características que se aproximam mais do real funcionamento de um organismo vivo, sendo aplicável a uma ampla gama de investigações e, como tal, serão modelos experimentais de grande futuro.

VII. Bibliografia

- ADEAR Center. (2011). Alzheimer's Disease Fact Sheet. *NIH Publication*, 11-6423(2011), 1–8.
- Amin-zaki, L., Majeed, M. a, Clarkson, T. W., & Greenwood, M. R. (1978). Methylmercury poisoning in Iraqi children: clinical observations over two years. *British Medical Journal*, 1(6113), 613–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1603391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Amorim, L. C. a. (2003). O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Revista Brasileira Med. Trab.*, 1(2), 124–132.
- Antonio, F., & Lacaz, D. C. (2003). Parte VIII - Qualidade de Vida: violência e saúde.
- Atherosclerosis and AD Analysis of data from the US National Alzheimer ' s. (2005). *Neurology*.
- Bae, H., Nichol, J., Foudeh, A., Zamanian, B., Kwon, C. H., & Khadenhosseini, A. (2010). Microengineering Approach for Directing Embryonic Stem Cell Differentiation. *Biomaterials As Stem Cell Niche*, 2(September 2010), 153–171. <http://doi.org/10.1007/8415>
- Baptista, K., & Kang, H. C. (2007). O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(4), 453–460. Retrieved from http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v04/pdf/revisao2.pdf
- Barnhart, C. D., Yang, D., & Lein, P. J. (2015). Using the Morris Water Maze to Assess Spatial Learning and Memory in Weanling Mice. *Plos One*, 10(4), e0124521. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124521>
- Block, F. (1999). Global Ischemia and Behavioural Deficits, 58(98).

- Borba Filho, G. L., Zenki, K. C., Kalinine, E., Baggio, S., Pettenuzzo, L., Zimmer, E. R., ... Onofre de Souza, D. (2015). A New Device for Step-Down Inhibitory Avoidance Task—Effects of Low and High Frequency in a Novel Device for Passive Inhibitory Avoidance Task That Avoids Bioimpedance Variations. *Plos One*, 10(2), e0116000. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0116000>
- Boucard, A., Béat, A.-M., Forster, R., Simonnard, A., & Froget, G. (2010). Evaluation of neurotoxicity potential in rats: the functional observational battery. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna (editor-in-Chief) ... [et Al.]*, Chapter 10, Unit 10.12. <http://doi.org/10.1002/0471141755.ph1012s51>
- Boyes, W. K. (2001). Neurotoxicology and Behavior. *Patty's Toxicology*, 1(11), 1–18. <http://doi.org/10.1002/0471435139.tox025>
- Caberlotto, L., Carboni, L., Zanderigo, F., Andreetta, F., Andreoli, M., Gentile, G., & Razzoli, M. (2013). Differential effects of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibition by lithium or selective inhibitors in the central nervous system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 386(10), 893–903. <http://doi.org/10.1007/s00210-013-0893-9>
- Carter, S. D., Mifsud, K. R., & Reul, J. M. H. M. (2015). Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(June), 156. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00156>
- Chambers, S. M., Mica, Y., Studer, L., & Tomishima, M. J. (2011). Neurodegeneration, 793, 87–97. <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8>
- Chen, C., Tang, Y., Jiang, X., Qi, Y., Cheng, S., Qiu, C., ... Tu, B. (2012). Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 125(1), 248–61. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfr265>
- Choi, Y. J., Yang, H. S., Jo, J. H., Lee, S. C., Park, T. Y., Choi, B. S., ... Huh, C. K. (2015). Anti-Amnesic Effect of Fermented Ganoderma lucidum Water Extracts by

- Lactic Acid Bacteria on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats, 20(March), 126–132. <http://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.2.126>
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7–12. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>
- Detrait, E., Hanon, E., Dardenne, B., & Lamberty, Y. (2008). Optimization and robustness of the inhibitory avoidance test for pharmacological screening on long-term memory. *Proceedings of Measuring Behavior*, 2008, 299–300.
- Engler, A. J., Rehfeldt, F., Sen, S., & Discher, D. E. (2007). Microtissue Elasticity: Measurements by Atomic Force Microscopy and Its Influence on Cell Differentiation. *Methods in Cell Biology*, 83(07), 521–545. [http://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83022-6](http://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83022-6)
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., & Tsai, L.-H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, 447(7141), 178–82. <http://doi.org/10.1038/nature05772>
- Fonck, C., Easter, A., Pietras, M. R., & Bialecki, R. A. (2015). *CNS Adverse Effects : From Functional Observation Battery / Irwin Tests to Electrophysiology*. <http://doi.org/10.1007/978-3-662-46943-9>
- Francia, G., & Kerbel, R. S. (2010). Raising the bar for cancer therapy models. *Nature Biotechnology*, 28(6), 561–562. <http://doi.org/10.1038/nbt0610-561>
- Freeman, G., Lordo, R., Singer, a, Peters, a, Neal, B., McConnell, E., & Mayes, B. (2000). An assessment of neurotoxicity of aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260 administered in diet to Sprague-Dawley rats for one year. *Toxicological Sciences*, 53(2), 377.
- Gehring, T. V., Luksys, G., Sandi, C., & Vasilaki, E. (2015). Detailed classification of swimming paths in the Morris Water Maze: multiple strategies within one trial. *Scientific Reports*, 5, 14562. <http://doi.org/10.1038/srep14562>

- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*, 13(3), 330–338. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70278-3](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3)
- Gundert-Remy, U., Barth, H., Birkle, a., Degen, G. H., & Landsiedel, R. (2015). Toxicology: a discipline in need of academic anchoring??the point of view of the German Society of Toxicology. *Archives of Toxicology*, 89(10), 1881–1893. <http://doi.org/10.1007/s00204-015-1577-7>
- Harada, M. (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(1), 1–24. <http://doi.org/10.3109/10408449509089885>
- Herring, N. R., Schaefer, T. L., Gudelsky, G. a, Vorhees, C. V, & Williams, T. (2008). NIH Public Access. *Psychopharmacology*, 199(4), 637–650. <http://doi.org/10.1007/s00213-008-1183-y.Effect>
- Horner, S. a, Gould, S., Noakes, J. P., Rattray, N. J., Allen, S. L., Zotova, E., & Arezzo, J. C. (2004). Lack of neurotoxicity of the vascular targeting agent ZD6126 following repeated i.v. dosing in the rat. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(7), 783–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15252139>
- in Silico. (2014). *Merriam-Webster*, in silico. Retrieved from [http://www.merriam-webster.com/dictionary/in silico](http://www.merriam-webster.com/dictionary/in%20silico)
- Jager, G., Kahn, R. S., Van Den Brink, W., Van Ree, J. M., & Ramsey, N. F. (2006). Long-term effects of frequent cannabis use on working memory and attention: An fMRI study. *Psychopharmacology*, 185(3), 358–368. <http://doi.org/10.1007/s00213-005-0298-7>
- Kepner, J. (2004). Synergy: The big unknowns of pesticide exposure. *Pesticides and You*, 23(4), 17–20. Retrieved from <http://beyondpesticides.org/infoservices/pesticidesandyou/Winter03-04/Synergy.pdf>

- Lalonde, R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1), 91–104. [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00041-0](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00041-0)
- Lin, Z., Dodd, C. a, Xiao, S., Krishna, S., Ye, X., Filipov, N. M., & Al, L. I. N. E. T. (2014). Gestational and Lactational Exposure to Atrazine via the Drinking Water Causes Specific Behavioral Deficits and Selectively Alters Monoaminergic Systems in C57BL / 6 Mouse Dams , Juvenile and Adult Offspring, 141(1), 90–102. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfu107>
- Liu, M., Guo, H., Li, C., Wang, D., Wu, J., Wang, C., ... Qin, R. (2015). Cognitive improvement of compound danshen in an A β 25-35 peptide-induced rat model of Alzheimer's disease. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 382. <http://doi.org/10.1186/s12906-015-0906-y>
- Llorens, J. (2013). Toxic neurofilamentous axonopathies- accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *Journal of Internal Medicine*, 273(5), 478–489. <http://doi.org/10.1111/joim.12030>
- Mackie, K., & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), 3825–3829. <http://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3825>
- Manuscript, A. (2010). Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for IMPORTANTE.pdf, 103(4), 655–663. <http://doi.org/10.1002/bit.22361>
- Markgraf, C. G., Cirino, M., & Meredith, J. (2010). Comparison of methods for analysis of functional observation battery (FOB) data. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(2), 89–94. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.06.001>
- Marrs, T. C., & Maynard, R. L. (2013). Neurotranmission systems as targets for toxicants: A review. *Cell Biology and Toxicology*, 29(6), 381–396. <http://doi.org/10.1007/s10565-013-9259-9>

- Mayadevi, M., Archana, G. M., Prabhu, R. R., & Omkumar, R. V. (2012). Molecular Mechanisms in Synaptic Plasticity. *Neuroscience - Dealing with Frontiers*. Retrieved from <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/32398.pdf>
- Milić, M., Divljaković, J., Rallapalli, S., van Linn, M. L., Timić, T., Cook, J. M., & Savić, M. M. (2012). The role of $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behavioural Pharmacology*, 23(2), 191–197. <http://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3283512c85>
- Moghadamnia, A. A., Hakiminia, S., Baradaran, M., Kazemi, S., & Ashrafpour, M. (2015). Vitamin D Improves Learning and Memory Impairment in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Archives of Iranian Medicine*, 18(6), 362–6. <http://doi.org/015186/AIM.007>
- Moreira, F. R., & Moreira, J. C. (2013). Os efeitos do chumbo sobre o Organismo humano e seu significado para a saúde. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 181(2), 226–32. <http://doi.org/10.1590/S1020-49892004000200007>
- Nakagawa, S., Deli, M. a., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, Á., ... Niwa, M. (2009). A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*, 54(3-4), 253–263. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002>
- Nature Nanotechnology. (2011). The dose makes the poison. *Nature Nanotechnology*, 6(June), 329. <http://doi.org/10.1038/nnano.2011.87>
- Neurotoxinas : y mecanismos de acción. (2009).
- Oit, O. I. D. T. (2014). A Segurança e a Saúde na utilização de produtos químicos no trabalho. Retrieved from <http://www.dnpst.eu/relatorio.php>
- Organização Mundial da Saúde. (2000). *Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente*.

- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, a, Mechoulam, R., & Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*, 413(6855), 527–531. <http://doi.org/10.1038/35097089>
- Park, S., & Park, K. (2016). Engineered Polymeric Hydrogels for 3D Tissue Models. *Polymers*, 8(1), 23. <http://doi.org/10.3390/polym8010023>
- Pedroza, A. C. (2011). Ensaio RevInter Ensaio, 82–95.
- Peres, F., Moreira, J. C., & Dubois, G. S. (2003). Agrotóxicos, Saúde e Ambiente: uma introdução ao tema. *É Veneno Ou É Remédio? Agrotóxicos, Saúde E Ambiente*, 20(Nrr 5), 21–42.
- Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. D. S., Lopes, N. P., & Epifanio, R. D. A. (2002). Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Quimica Nova*, 25(SUPPL. 1), 45–61. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>
- Popoff, M. R., & Poulain, B. (2010). Bacterial toxins and the nervous system: Neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins*, 2(4), 683–737. <http://doi.org/10.3390/toxins2040683>
- Preto, R. I. O., Paulo, S. Ã. O., Melo, C. D. A., Moreira, A. B., & Bisinoti, C. (2009). Quim. Nova, 32(6), 1436–1441.
- Prince, M., & Jackson, J. (2009). World Alzheimer Report 2009. *Alzheimer's Disease International*, 1–96.
- Qing, H., He, G., Ly, P. T. T., Fox, C. J., Staufenbiel, M., Cai, F., ... Song, W. (2008). Valproic acid inhibits A production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2781–2789. <http://doi.org/10.1084/jem.20081588>
- Quinn, D. K., McGahee, S. M., Politte, L. C., Duncan, G. N., Cusin, C., Hopwood, C. J., & Stern, T. a. (2009). Complications of carbon monoxide poisoning: a case discussion and review of the literature. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 11(2), 74–9. <http://doi.org/10.4088/PCC.08r00651>

- Rains, G. D. (2004). Capítulo 2. mecanismos neuronales en los niveles molecular y celular BT - Principios de neuropsicología humana. *Principios de Neuropsicología Humana*, 533. Retrieved from http://books.google.es/books?id=C6ISOWAACAAJ&dq=intitle:principios+de+neuropsicologia&hl=&cd=2&source=gbp_api\papers2://publication/uuid/2C13FEA8-95A6-4E63-999C-AD29DC878002
- Rosa, R., Hodgson, M., Lunsford, R., & Jenkins, E. (2000). Worker Health Chartbook 2000. NIOSH Publ no 2000-127. Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health, 2000. *Health (San Francisco)*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Worker+Health+Chartbook+,+2000#0>
- Rubovitch, V., Gafni, M., & Sarne, Y. (2002). The cannabinoid agonist DALN positively modulates L-type voltage-dependent calcium-channels in N18TG2 neuroblastoma cells. *Molecular Brain Research*, 101(1-2), 93–102. [http://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00174-2](http://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00174-2)
- Saadati, H., Babri, S., Ahmadiasl, N., & Mashhadi, M. (2010). Effects of exercise on memory consolidation and retrieval of passive avoidance learning in young male rats. *Asian Journal of Sports Medicine*, 1(3), 137–42.
- Sarne, Y., Asaf, F., Fishbein, M., Gafni, M., & Keren, O. (2011). The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1391–1401. <http://doi.org/10.1111/bph.2011.163>
- Sarne, Y., & Keren, O. (2004). Are cannabinoid drugs neurotoxic or neuroprotective? *Medical Hypotheses*, 63(2), 187–192. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.02.043>
- Saxena, S., & Caroni, P. (2007). Mechanisms of axon degeneration: From development to disease. *Progress in Neurobiology*, 83(3), 174–191. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.07.007>
- Schneider, A. M., Wilkins, E., Firestone, A., Everbach, E. C., Naylor, J. C., & Simson, P. E. (2003). Enhanced Retention in the Passive-Avoidance Task By 5-HT 1A Receptor Blockade Is Not Associated With Increased Activity of the Central

- Nucleus of the Amygdala. *Learning & Memory*, 394–400.
<http://doi.org/10.1101/lm.54903.5-HT>
- Sci, B. E. (2015). Original Article Neurobehavioral Assessment of Rats Exposed to Yttrium Nitrate during Development *, 28(4), 281–290.
<http://doi.org/10.3967/bes2015.039>
- Seliktar, D. (2012). Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6085), 1124–8.
<http://doi.org/10.1126/science.1214804>
- Sharma, H. S., Menon, P., Lafuente, J. V., Muresanu, D. F., Tian, Z. R., Patnaik, R., & Sharma, A. (2014). Development of *in vivo* drug-induced neurotoxicity models. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(12), 1637–1661.
<http://doi.org/10.1517/17425255.2014.970168>
- Shen, M., Piser, T. M., Seybold, V. S., & Thayer, S. a. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(14), 4322–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8699243>
- Skerfving, S. B., & Copplestone, J. F. (1976). Poisoning caused by the consumption of organomercury dressed seed in Iraq. *Bulletin of the World Health Organization*, 54(1), 101–112.
- Solowij, N. (2002). Cognitive Functioning of Long-term Heavy Cannabis Users Seeking Treatment. *The Journal of the American Medical Association*, 287(9), 1123.
<http://doi.org/10.1001/jama.287.9.1123>
- Stuchlík, a, Petrásek, T., Prokopová, I., Holubová, K., Hatalová, H., Valeš, K., ... Wesierska, M. (2013). Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory. *Physiological Research*, 62 Suppl 1, S1–S19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24329689>

- Sun, X., He, G., & Song, W. (2006). BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20, 1369–76. <http://doi.org/10.1096/fj.05-5632com>
- Swinburn, T. (2014). Economic Impacts of Lead Exposure and Remediation in Michigan, 28. Retrieved from <http://origin.library.constantcontact.com/download/get/file/1104539807036-161/Economic+Impact+of+Lead+in+Michigan+Web.pdf>
- Tomatsu, I., Peng, K., & Kros, A. (2011). Photoresponsive hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(14-15), 1257–1266. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.009>
- Traumatologia, E. M., & Aparelho, D. O. (n.d.). *Le s ã o d o s n e r v o s p e r i f é r i c o s*.
- Tselnicker, I., Keren, O., Hefetz, A., Pick, C. G., & Sarne, Y. (2007). A single low dose of tetrahydrocannabinol induces long-term cognitive deficits. *Neuroscience Letters*, 411(2), 108–111. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.033>
- Uva, A. D. S., & Faria, M. (2000). Exposição profissional a substâncias químicas : diagnóstico das situações de risco. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 18, 5–10.
- Van der Stelt, M., Veldhuis, W. B., Bär, P. R., Veldink, G. a, Vliegthart, J. F., & Nicolay, K. (2001). Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6475–6479. <http://doi.org/21/17/6475> [pii]
- Vermeer, S. E., Prins, N. D., den Heijer, T., Hofman, a, Koudstaal, P. J., & Breteler, M. M. (2003). Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med*, 348(13), 1215–1222. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa022066>
- Viaene, M. (2002). Overview of the neurotoxic effects in solvent-exposed workers. *Arch Public Health*, 217–232. Retrieved from <http://www.national-toxicencephalopathy-foundation.org/solvent.pdf>

- Vishal, S., Sourabh, A., & Harkirat, S. (2011). Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *Journal of Medical Biography*, 19(1), 32–33. <http://doi.org/10.1258/jmb.2010.010037>
- Wang, Z., Zhang, X. J., Li, T., Li, J., Tang, Y., & Le, W. (2014). Valproic acid reduces neuritic plaque formation and improves learning deficits in APPSwe/PS1A246E transgenic mice via preventing the prenatal hypoxia-induced down-regulation of neprilysin. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 20(3), 209–217. <http://doi.org/10.1111/cns.12186>
- West, S. G. (2006). The Nervous System. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 707–747.
- White, L., Petrovitch, H., Hardman, J., Nelson, J., Davis, D. G., Ross, G. W., ... Markesbery, W. R. (2002). Cerebrovascular pathology and dementia in autopsied Honolulu-Asia Aging Study participants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 977, 9–23. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04794.x>
- Who, W. H. O. (2012). *World Health Statistics*. WHO World Health Organization (Vol. 27). <http://doi.org/10.2307/3348165>
- Wilby, J., Kainth, a., Hawkins, N., Epstein, D., McIntosh, H., McDaid, C., ... Forbes, C. (2005). Clinical effectiveness, tolerability and cost-effectiveness of newer drugs for epilepsy in adults: A systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 9(15).
- Williams, R. S. B., Cheng, L., Mudge, A. W., & Harwood, A. J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*, 417(6886), 292–295. <http://doi.org/10.1038/417292a>
- World Health Organization. (2002). *Relatório mundial da saúde - Saúde mental: nova concepção, nova esperança*.
- World Health Organization. (2011). WHO Public Health & Environment Global Strategy Overview, 1–11.

- Yao, Z.-G., Liang, L., Liu, Y., Zhang, L., Zhu, H., Huang, L., & Qin, C. (2014). Valproate Improves Memory Deficits in an Alzheimer's disease Mouse Model: Investigation of Possible Mechanisms of Action. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 805–812. <http://doi.org/10.1007/s10571-013-0012-y>
- Yuan, P. X., Huang, L. D., Jiang, Y. M., Gutkind, J. S., Manji, H. K., & Chen, G. (2001). The Mood Stabilizer Valproic Acid Activates Mitogen-activated Protein Kinases and Promotes Neurite Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31674–31683. <http://doi.org/10.1074/jbc.M104309200>
- Zhang, X. Z., Li, X. J., & Zhang, H. Y. (2010). Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 81(1), 3–6. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.003>